

substitute claims) and the remarks set out below.

Support for the amendment

No new matter has been added, and support for the claims now pending herein is present in the same places as for previous claims 49, and 60-61 and 64-65 (in previous claim 56, at pages 21-22 (Example VIII), and Table 8; previous claim 57 and in the specification support therefor; and in previous claim 59 and in the specification support therefor).

Summary Statement Regarding Patentability of the Claimed Invention

Because the Examiner did not respond to Applicants' previously amendment in the parent application hereto, regarding claims 49, 60-61 and 64-65, Applicants repeat herein the statement found in the parent application.

The invention as claimed herein is not obvious in view of the cited art because none of the cited references or the combination thereof teach or suggest selecting a Lactobacillus reuteri strain which produces β -hydroxypropionaldehyde under anaerobic conditions and in the presence of glycerol or glyceraldehyde, nor do they teach or suggest this process step in combination with addition of the L. reuteri to foods, to other bacteria or to the gastrointestinal tract of an animal.

Applicants respectfully submit that even if a prior publication had reported on how a researcher had gathered up all

of the "L. fermentum" strains which had ever been isolated and had added them to foods, other bacteria, or the gastrointestinal tract, it would not have been obvious to one of skill in the art prior to such an experiment that some of these strains (now classified as L. reuteri) would produce the antibiotic β -hydroxypropionaldehyde, nor would it have been obvious how to select such strains from the group of "L. fermentum" and to use them as described in the claimed invention.

Response to the Examiner

In the most recent Office Action of November 16, 1993 on the parent of the parent application herein, the Examiner took the following actions which are of relevance to the instant application and for which Applicants' amendments have not been responded to by the Examiner in writing: (1) stated that the specification should be reviewed for errors, in particular Figures 13A and 13B; (2) rejected claim 59 (corresponding to claim 64 as added by the amendment of March 16, 1994 in the parent application, and now to new claim 69 added herein) under the judicially created doctrine of obviousness-type double patenting as being unpatentable over claims 38 and 39 of copending S.N. 08/081,838 (our file BIOA 5041P); (3) rejected claims 49 and 56-57 and 59 (corresponding to claim 49 and claims 60, 61 and 64 added in the amendment of March 16, 1994, and now to new claims 67-69 now pending herein) under 35 U.S.C. §112, first and second paragraphs with respect to (a) "more inhibitory

of bacterial numbers...glyceraldehyde" (claim 49), (b) the concentration of glycerol or glyceraldehyde; (c) "50 units"; (d) "being genetically characterizable"; (e) "reduced at least 10²-fold lower" (claim 56; now claim 67); (f) "providing the presence of a precursor substance"; (g) "without adding glucose"; (h) 10⁸ cells of L. reuteri per ml (per g of food item); (i) providing the presence...(claim 57; now claim 68); (j) "the number of added cells....of about 10-fold less than the initial number of said bacteria" (claim 57(b)); (k) "probiotic effect" (claim 59; now claim 69); (l) "an amount sufficient to colonize" (claim 59; now claim 69); (4) objected to the specification under 35 U.S.C. §112, first paragraph with respect to (a) "preservation"; (b) a "unit" of β-hydroxypropionaldehyde; (c) ratio of β-hydroxypropionaldehyde to food; (d) the support for at least about 50 units of β-hydroxypropionaldehyde (claim 49); (e) the support for production of β-hydroxypropionaldehyde under any and all storage conditions (claim 56; now claim 67), stating that these terms were new matter and should be deleted; (5) rejected claims 49 and 56 (now claim 67) under 35 U.S.C. §112, first paragraph for the reasons set forth in the objection above; (6) objected to the specification under 35 U.S.C. §112, first paragraph, for reasons provided in the previous office action; (7) rejected claims 49, 56 and 57 (now claims 49, 67 and 68) under 35 U.S.C. 112, first paragraph for (a) the reasons set forth in the objection, and (b) the declaration of Dr. Casas-Perez does not include the concentration of L. reuteri, the form

of L. reuteri, or what else is in the preparation, and spraying or in ovo injection do not bear a clear relation to feeding, and the experiments only deal with S. typhimurium, (c) the conclusions regarding correlation with in vitro work is not substantiated by the evidence; (8) rejected claim 59 (now claim 69) under 35 U.S.C. §102(e) as anticipated by or, in the alternative, under 35 U.S.C. §103 as obvious over Nurmi et al., newly cited in light of Sarra et al., stating that the claim does not specify what has been done to assure that glycerol is "co-present" and that Nurmi's L. fermentum has not been shown by Applicant to be different from L. reuteri used by Applicant; (9) rejected claim 59 (now 69) under 35 U.S.C. §102(b) as anticipated by or, in the alternative, under 35 U.S.C. §103 as obvious over Snoeyenbos et al. in light of Nurmi et al. (newly cited) and Sarra et al.; (10) rejected claims 57 and 59 (now claims 68 and 69) under 35 U.S.C. §103 as being unpatentable over Snoeyenbos et al., taken with Nurmi et al. (newly cited), Sarra et al., Sandine et al., and Goldin et al., stating in addition to statements made in the previous rejections, that the declaration of Dr. Casas-Perez is not commensurate in scope with the degree of protection sought by the claim, requested the complete citation for a publication mentioned in 08/088,407 (our file BIOA 5055P), stated that the correct classification of the strains in the references has not been established on the record; and (11) rejected claims 49, 56 and 57 (now claims 49, 67 and 68) under 35 U.S.C. §103 as being unpatentable over Kawai et al., Yokokura et al., Sarra et

al., Sobolov et al. and Litchfield et al. These rejections are traversed in application to the claims as amended, and consideration is requested of the patentability of claims 49 and 67-70 now pending in the application.

Because the Examiner did not respond to Applicants' remarks and the previous amendment in the parent application hereto, regarding claims 49, 60-61 and 64-65, Applicants repeat herein the relevant statements found in Applicants' amendment of March 16, 1994, in the parent application.

(1) Statement that the specification should be reviewed for errors

Applicants have reviewed the application for errors, and in particular, with respect to Figures 13A and 13B, Applicants have amended page 8 at lines 4 and 7 to correct the inadvertent typographic error in describing the two parts of Figure 13. Support for these corrections is clearly found in the specification describing the Figures and in the Figures and figure legends themselves. In particular, the figure labeled "Figure 13A" has the vertical axis simply labeled "CFU ml⁻¹ or PFU ml⁻¹" and the figure labeled "Figure 13B" has the vertical axis labeled the same plus the word "percent" in parentheses. This labeling plus the fact that the largest number on the vertical axis for Figure 13B is "100", while Figure 13A has numbers ranging to "10⁵" clearly shows that the description of Figure 13A as showing "percent" is incorrect, as is the

description of Figure 13B as showing "actual counts". Therefore, Applicants have amended to figure legend on page 8 to correctly describe what is shown in these two figures.

Applicants have also corrected the reference to prior applications on page 2 of the specification, and have corrected the title to that found acceptable by the Examiner in the parent applications.

(2) Rejection of claims 58-59 under the judicially created doctrine of obviousness-type double patenting

Claim 59 corresponds to currently pending claim 69. Applicants will submit a terminal disclaimer with respect to this application, when the application is otherwise deemed to be in allowable form.

(3) Rejection of claims 49 and 56-59 under 35 U.S.C. §112, first and second paragraphs:

(a) "more inhibitory of bacterial numbers...glyceraldehyde"
(claim 49)

Claim 49 was amended in the parent application preliminary amendment to recite "said method reducing the number of bacteria more than does treatment with 250 mM glycerol or glyceraldehyde. Applicants respectfully submit that this amendment clearly and definitely specifies the reduction in the number of bacteria.

(b) the concentration of glycerol or glyceraldehyde

Applicants have amended claim 49 to recite the concentration

of glycerol or glyceraldehyde, and therefore submit that this concern of the Examiner has been overcome.

(c) "50 units"

Applicants respectfully submit that "units" of reuterin (β -hydroxypropionaldehyde are clearly defined on page 17 as discussed above; however, to clarify claim 49, Applicants have converted the "50 units" to " μ g" of antibiotic as specified on that page.

(d) "being genetically characterizable"

In substitute claims 67 and 68, Applicants have deleted this terminology to being unnecessary, in accord with the Examiner's allowed terminology of claim 66 in the parent application hereto.

(e) "reduced at least 10^2 -fold lower" (claim 56)

In substitute claim 67, Applicants have added terminology so the comparison in the claim is to "an untreated control food item after 4 days". Applicants therefore respectfully submit that claim 67 replacing claim 56 clearly recites a comparison of the number of bacteria in the treated items with the number of bacteria in the untreated item at the same time period (4 days) of incubation. Applicants have also deleted the word "lower" from the preamble of this claim as being redundant.

(f) "providing the presence of a precursor substance"

In substitute claims 67 and 68, Applicants have clarified the terminology by using the word "adding".

(g) "without adding glucose"

Applicants have deleted this terminology in the claims

pending herein.

(h) 10⁸ cells of L. reuteri per ml (per g of food item)

Applicants have replaced this terminology with the previously intended terminology of "per gram of food item" in claim 67 pending herein as a replacement claim for claim 56. Applicants therefore submit that claim 67 clearly recites the proportion of cells with respect to the food.

(i) providing the presence...(claim 57)

Claim 68 has also been changed to delete this terminology and recite "adding".

(j) "the number of added cells....of about 10-fold less than the initial number of said bacteria" (claim 57(b))

Claim 68(b) replacing claim 57(b) has been changed to recite: "the number of added cells of Lactobacillus reuteri being about 10-fold less than the number of said non-Lactobacillus reuteri bacteria present prior to said treatment". Applicants respectfully submit that this terminology clearly specifies the relative number of L. reuteri added as compared to the non-L. reuteri bacteria, and more clearly defines "said bacteria".

(k) "probiotic effect" (claim 59)

Substitute claim 69 now pending herein now recites "A method for providing a probiotic to the gastrointestinal tract of an animal...." This terminology is clear and definite as a term used to state that the substance provided a benefit to the animal to which it was given, and was clearly described in the

specification (see, for example, page 2, lines 12-15, and in the publications cited in the specification). Applicants also respectfully refer to the enclosed reviews (reviews by Fuller, Fox and Parker) who have discussed this long-used term which is well-known in the art. Applicants therefore submit that the claims as now worded with the term "probiotic" are clearly defined and enabled by the application.

(1) "an amount sufficient to colonize" (claim 59)

Applicants respectfully submit that this terminology in pending claim 69 is clear and well-supported by the specification. One of skill in the art would clearly know what colonization is and what levels of treatment with Lactobacillus reuteri would be likely to be successful, knowing that the amount of cells used to feed to pigs enabled such colonization as described in the specification. Preliminary routine experimentation in an unknown animal system (for example, a particular type, age and condition of animal) allows simple determination of the amount of inoculum that results in colonization for that animal system. Colonization of a particular system by L. reuteri is easy to determine using the methods set forth in the instant application (e.g., the overlay method described at page 9, line 15 to page 10, line 16), which are specific for L. reuteri.

Applicants respectfully submit that claims 49 and 67-69 (replacing claims 56-57 and 59) are patentable under 35 U.S.C. §112, first and second paragraphs.

(4) Objection to the specification under 35 U.S.C. §112, first paragraph:

(a) "preservation"

While Applicants continue to submit that the "preservation" of a food item, with respect to an untreated food item, is clearly accomplished by reduction of the numbers of bacteria, Applicants have amended claim 49 and has changed the terminology in replacement claim 67 (for claim 56) to recite "reducing the number of bacteria" to more clearly describe the claimed invention.

(b) a "unit" of β -hydroxypropionaldehyde

As discussed above in response #5(c), Applicants have amended the claims to specifically recite the number of micrograms of β -hydroxypropionaldehyde utilized.

(c) ratio of β -hydroxypropionaldehyde to food

As discussed above in response #3(h), claim 49 now pending herein clearly recites the ratio of β -hydroxypropionaldehyde to food.

(d) the support for about 50 units of β -hydroxypropionaldehyde (claim 49)

As discussed in the previously filed Amendment, and at page 20, line 15 to page 22, line 23, about 50 units of the antibiotic (shown in the specification to be β -hydroxypropionaldehyde) is effective in reducing bacterial numbers.

- (e) the support for production of β -hydroxypropionaldehyde under any and all storage conditions (pending claim 67 corresponds to previous claim 56), stating that these terms were new matter and should be deleted

Applicants respectfully submit that the specification, for example, Figure 3, indicates that β -hydroxypropionaldehyde is produced at a wide variety of temperatures, including body temperature (37°C), room temperature (about 25°C), down to below normal refrigeration temperatures (results shown at 4°C). Applicants have amended the claims to recite placing the food item under storage conditions wherein the Lactobacillus reuteri strain is able to produce β -hydroxypropionaldehyde. Applicants respectfully submit that such conditions are clearly defined in the specification.

Applicants therefore submit that the specification meets the requirement of 35 U.S.C. §112, first paragraph.

- (5) Rejection of claims 49 and 56 under 35 U.S.C. §112, first paragraph for the reasons set forth in the objection above

Applicants respectfully incorporate herein the above remarks, and submit that claims 49 and 67 (replacing claim 56) meet the requirements of 35 U.S.C. §112, first paragraph.

(6) Objection to the specification under 35 U.S.C. §112, first paragraph, for reasons provided in the previous office action

Applicants respectfully incorporate herein their responses to this objection as filed on September 24, 1993 in the parent of the parent application. Although Applicants are not absolutely sure which particular objection under 35 U.S.C. §112, first paragraph is meant by the Examiner here, Applicants assume that what Applicants termed #"(9)" in the amendment filed on September 24, 1993 contains the particular points the Examiner wishes to have addressed herein, since these matters are not otherwise discussed herein as being either relevant or moot. Should this assumption by Applicants be incorrect, Applicants respectfully request a chance to respond to whatever other point(s) the Examiner wished to have addressed herein.

Thus, in response to this rejection under 35 U.S.C. §112, first paragraph, Applicants respectfully submit that the claims pending herein each specify dosage of the β -hydroxypropionaldehyde or L. reuteri and that therefore the claims clearly define the invention. Further, the wording of each claim, along with knowledge and skill of one of skill in the art is enabling for dosage under 35 U.S.C. §112, first paragraph. In response to the Examiner's concern regarding the microorganisms covered by the claims, although it is Applicants' position that the specification provides support for including all of these microorganisms in the claims, the claims now pending

herein are limited to bacteria in order to increase the possibility of allowance.

In response to the Examiner's statements regarding in vivo studies, Applicants respectfully submit that the previously submitted declaration of inventor Walter J. Dobrogosz on in vivo mouse studies in combination with the attached affidavit reporting on further in vivo studies clearly show both that use of L. reuteri in vivo results in production of β -hydroxypropionaldehyde by L. reuteri, and the in vivo results are positively correlated with the in vitro results. Thus, the data in the specification plus the data presented by Applicants by affidavit and declaration clearly show that there is a good correlation between in vitro and in vivo results.

In response to the Examiner's earlier point regarding growth of L. reuteri in vivo, Applicants respectfully reiterate that growth (meaning increase of microbial numbers) of L. reuteri per se is not required for production of β -hydroxypropionaldehyde by L. reuteri (see, for example, page 12, lines 20-23), but rather, what is required for production of β -hydroxypropionaldehyde by L. reuteri is anaerobiosis and the presence of glycerol and glyceraldehyde, which are included within the specified claimed conditions.

Applicants therefore submit that for all of the above reasons, the specification is patentable under 35 U.S.C. §112, first paragraph.

(7) Rejection of claims 49, 56 and 57 under 35 U.S.C. 112, first paragraph:

(a) the reasons set forth in the objection

Applicants respectfully incorporate herein the remarks made above with respect to the objection to the specification.

(b) declaration of Dr. Casas-Perez

Applicants respectfully submit the attached affidavit of Ivan A. Casas-Perez which provides the information requested by the Examiner with respect to the previously discussed in vivo research. In addition, this affidavit also provides experimental information on experiments performed with L. reuteri and E. coli in vivo. Applicants respectfully submit that it is clear from this affidavit and the previously filed affidavit that the results of these in vivo experiments show that the claimed invention is enabled by the specification. One of skill in the art using the procedures discussed in the specification (selection of antibiotic-producing L. reuteri and feeding of the L. reuteri to animal), along with procedures known to those of skill in the art as was done by Dr. Casas-Perez, would find sufficient enablement to practice the claimed invention.

Applicants further submit that both spraying and in ovo injection bear a clear relationship to feeding in that in both of these cases and in the case of traditional "feeding" the only known way that the substance being applied actually gets into the gastrointestinal tract is by ingestion. If amending the claims to recite ingestion would meet this objection and be allowable to

the Examiner, Applicants respectfully request either a telephonic conference on this matter in particular, or an Examiner's amendment.

- (c) the conclusions regarding correlation with in vitro work is not substantiated by the evidence

Applicants respectfully incorporate herein the above remarks made with respect to in vivo results, including the previously submitted declaration of Dr. Dobrogosz and the attached affidavit of Dr. Casas-Perez. Applicants inadvertently submitted a copy of this affidavit when the amendment was filed in response to the final rejection in the parent application, but the original is enclosed herein.

Applicants therefore submit that the specification meets the requirements of 35 U.S.C. §112, first paragraph, and that claims 49, and 60-65 also therefore meet the requirements of this section.

- (8) Rejection of claim 59 under 35 U.S.C. §102(e) as anticipated by or, in the alternative, under 35 U.S.C. §103 as obvious over Nurmi et al., newly cited in light of Sarra et al.

The examiner has newly cited Nurmi et al. Nurmi et al. teaches a process for the production of a bacterial preparation for the prophylaxis of intestinal disturbances in poultry. This process specifically includes isolation of the bacteria by a process in which a washed caecum is minced and diluted, and then plated on a Lactobacillus selective medium (column 4, lines 15-

54). Bacteria which adhere to epithelial cells are visually selected (column 4, lines 56-60) and tested for adhering ability (column 4, lines 60-62). Not only does Nurmi et al. not teach or suggest the use of L. reuteri, but also Nurmi specifically states that it is not even necessary to identify the strains so long as they are "well adhering" bacterial strains (column 5, lines 45-56).

There is also no teaching in Nurmi et al. of selection of any of any strains used produces an antibiotic under anaerobic conditions in the presence of glycerol or glyceraldehyde, nor of use of any such strain(s), nor that any strains used produce β -hydroxypropionaldehyde under these or any conditions.

Finally Nurmi's claimed invention requires "at least four anaerobically co-cultured strains" (claims 1 and 2, and all of the rest of the claims which depend therefrom). The specification of Nurmi et al. teaches that these strains were from more than one species (e.g., Lactobacillus fermentum, L. lactis, and L. acidophilus). There is no teaching in Nurmi et al. that any single strain should or could be used according to Nurmi's invention, that there would be any efficacy in using a single strain, nor that selection of a strain of a single species, L. reuteri, in particular, according to Applicants' claimed invention, could be done or would be useful.

As pointed out by the Examiner, Sarra et al. teaches that certain strains previously classified as L. fermentum should be classified as L. reuteri. Applicants respectfully submit that

the evidence in papers published by researchers (attached publications in German: Lerche and Reuter, Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 1 Orig. 185.S.446-481 (1962); and Reuter, Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 1 Orig. 197.S.468-487 (1965)) who have tested so-called L. fermentum strains clearly indicates that not all previously classified L. fermentum strains are "Biotyp II" (later classified as L. reuteri as discussed in the previously provided Kandler & Weiss publication). It is clear from a simple review of the data shown in Table 3 of the paper of Reuter, even if the remainder of the German paper is not translated, that although many different sources of L. fermentum isolates were tested to see the biotypes of "L. fermenti" which were present, many of these strains were not biotype II. It is evident that it is likely that from any one series of gastrointestinal isolates previously classified as "L. fermentum" it is likely that some would be still classified as L. fermentum and others would be classified as L. reuteri. These papers are taxonomic studies upon which L. reuteri taxonomy is based, as already submitted to the Examiner (Kandler & Weiss reference), and not related particularly to antibiotic production by these species. Therefore Applicants do not have a translation of these papers and do not think such a translation is necessary to understanding of these tables. If obtaining a patent on the invention claimed herein is nonetheless deemed by the Examiner to require a translation of one or both papers, Applicants will

attempt to obtain such a translation or translations.

Applicants respectfully submit that nothing in these tables in these German papers, nor any of the cited papers, nor in the combination thereof teaches or suggests a method including selecting a strain of L. reuteri which produces β -hydroxypropionaldehyde according to Applicants' claimed invention. Furthermore, even if one or more of the strains used by Nurmi et al. actually were L. reuteri, there is no teaching in either Nurmi et al. or in Sarra et al., or in their combination, that strains be selected on the basis of their production of β -hydroxypropionaldehyde under the specified conditions. In fact, neither cited reference, nor their combination, teaches or suggests any type of analysis of the strains used for antimicrobial activity, nor the use of only one strain, nor the use of strains so selected according to the claimed invention herein.

With respect to the Examiner's statement regarding the co-presence of glycerol or glyceraldehyde, Applicants respectfully submit that it is well known in the art that these compounds are normal intermediates and products of biometabolism, and that they are present in most gastrointestinal tracts inherently as concluded by the Examiner and as previously presented to the Examiner by Applicants.

With respect to the Examiner's statement that the disclosed "L. fermentum" strain appears to be identical to the presently claimed strain of L. reuteri (see, e.g., since it is also found

in the gastrointestinal tract of the chick", Applicants again submit that this statement is speculative in that there is no evidence that any strains used in the cited references were L. reuteri. Furthermore, it is clear that (a) the strains used by Nurmi et al. were isolated from the adult chicken; and (b) the gastrointestinal tract of any adult animal contains many, many different species. Therefore, the fact that two different strains were both isolated from an animal of the same species, or even from the exact same animal is not dispositive or even relevant in deciding whether the two species are the same. The method of selection for the particular isolated microorganism and the characteristics of the microorganism are what determines to which species the isolate belongs. Nurmi et al. themselves isolated strains of multiple Lactobacillus species from their chickens using the same isolation method--adherence to the chicken gastrointestinal cells. Even if the strains of Nurmi et al. and Applicants were the same, however, Applicants respectfully incorporate herein the above discussion showing that there is no teaching or suggestion in the cited reference of selecting a strain according to the claimed invention.

In contrast, Applicants' selection process step only allows selection of strains of a single species-L. reuteri. Neither Nurmi et al. nor Sarra et al. nor the combination thereof teach such a step. Thus, the claimed invention, including the selection process and the feeding the animal cells of said strain of Lactobacillus reuteri in an amount sufficient to colonize the

gastrointestinal tract of said animal is neither taught or suggested by the combined references of Nurmi et al. and Sarra et al.

Applicants therefore submit that claim 69 (replacing claim 59) and claim 70 which depends therefrom and contains all of the limitations thereof are patentable under 35 U.S.C. §102(e), or in the alternative, under 35 U.S.C. §103 over Nurmi et al., newly cited in light of Sarra et al.

- (9) Rejection of claim 59 under 35 U.S.C. §102(b) as anticipated by or, in the alternative, under 35 U.S.C. §103 as obvious over Snoeyenbos et al. in light of Nurmi et al. (newly cited) and Sarra et al.

Applicants incorporate herein the above remarks made with respect to claim 69 and Nurmi et al. and Sarra et al.

Snoeyenbos et al., which is also newly cited herein, teaches the feeding of chicks with bacteria obtained by incubating fecal droppings as summarized by the Examiner. The "effective microflora" of Snoeyenbos et al. is isolated by serial anaerobic culture in VL broth with 10% fecal extract and 5% liver extract (column 3, lines 21-45).

Snoeyenbos et al. either separately, or in combination with Nurmi et al. and Sarra et al., does not teach or suggest the use of L. reuteri, the selection of any strains used producing an antibiotic under anaerobic conditions in the presence of glycerol or glyceraldehyde, that they produce β -hydroxypropionaldehyde

under these or any conditions, that any single strain should or could be used, that there would be any efficacy in using a single strain, or that selection of a strain of a single species, L. reuteri, in particular, according to Applicants' claimed invention, could be done or would be useful. There is no teaching in any of these references nor in their combination that strains be selected on the basis of their production of β -hydroxypropionaldehyde under the specified conditions. In fact, no cited reference, nor their combination, teaches or suggests any type of analysis of the strains used for antimicrobial activity, nor the use of only one strain, nor the use of strains so selected.

The Examiner referred to the publication by Dr. Dobrogosz et al. Applicants first respond by stating that the citation for the Dobrogosz reference mentioned by the Examiner is as follows: Dobrogosz, WJ, Casas IA, Pagano, GA, Talarico, TL, Sjoberg, B, and M Karlsson, Lactobacillus reuteri and the Enteric Microbiota, in Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora, from the Gustafsen Symposium, McMillan Ltd, 1989, pages 283-292.

Second, the Examiner said that this publication "acknowledged that L. reuteri has often been misclassified as L. fermentum in the past", that "there is a reasonable likelihood/possibility that the reference strains are properly L. reuteri" and that therefore, "the burden of establishing non-anticipation by objective evidence shifted to Applicants". Applicants respectfully submit that (a) it is pure speculation to

state that strains used in the cited references were L. reuteri, and that therefore, the Examiner has not met the burden of basing the rejection on a factual basis as required (see, for example, In re Warner and Warner, 154 USPQ 173, 178 (CCPA 1967) ("The Patent Office...may not, because it may doubt that the invention is patentable, resort to speculation, unfounded assumptions or hindsight reconstruction to supply deficiencies in its factual basis").

Furthermore, it is well established that for a rejection based on inherency to be valid, inherency must be a necessary result, and not merely a possible result of what was done in the cited art. See In re Oelrich 221 USPQ 323 (CCPA 1981) and Ex parte Keith et al., 154 USPQ 320 (Pat. Off. Bd. App. 1966).

Thus, even if some of the strains previously used produced reuterin, there is no teaching in the references nor any evidence for use of L. reuteri in all cases, nor for any method of selecting for L. reuteri strains which produce β -hydroxypropionaldehyde.

Applicants therefore submit that claim 69 replacing claim 59 is patentable under 35 U.S.C. §102(b) and under 35 U.S.C. §103 as obvious over Snoeyenbos et al. in light of Nurmi et al. (newly cited) and Sarra et al.

(10) Rejection of claims 57-59 under 35 U.S.C. §103 as being unpatentable over Snoeyenbos et al., taken with Nurmi et al. (newly cited), Sarra et al., Sandine et al., and Goldin et al.

Applicants incorporate herein the above remarks regarding Snoeyenbos et al., Nurmi et al., and Sarra et al., as well as regarding the citation of the Dobrogosz paper and the affidavit of Casas-Perez.

Goldin et al., which was not cited in the previous office action, teaches the use of L. acidophilus supplements on human fecal bacterial enzymes. Sandine et al., which also was not cited in the previous office action, teaches that lactic acid bacteria may be used to maintain healthful conditions in the vagina and gastrointestinal tract.

Even if Sandine et al. and Goldin et al. are combined with these three references there is no teaching or suggestion of the use of L. reuteri, the selection of any strains used producing an antibiotic under anaerobic conditions in the presence of glycerol or glyceraldehyde, that they produce β -hydroxypropionaldehyde under these or any conditions, that any single strain should or could be used, that there would be any efficacy in using a single strain, or that selection of a strain of a single species, L. reuteri, in particular, according to Applicants' claimed invention, could be done or would be useful. There is no teaching in any of these references nor in their combination that strains be selected on the basis of their production of

β hydroxypropionaldehyde under the specified conditions.

Applicants therefore submit that claims 68 and 69, respectively, replacing claims 57 and 59, and claim 70 which depend from and contain all of the limitations thereof, are patentable under 35 U.S.C. §103 over Snoeyenbos et al., taken with Nurmi et al. (newly cited), Sarra et al., Sandine et al., and Goldin et al.

(11) Rejection of claims 49, 56 and 57 under 35 U.S.C. §103 as being unpatentable over Kawai et al., Yokokura et al., Sarra et al., Sobolov et al. and Litchfield et al.

Applicants hereby incorporate herein the remarks made in previous amendments regarding these references. Applicants also incorporate herein the above remarks with respect to the L. reuteri/L. fermentum issue raised by the Examiner again under this rejection.

In addition, Applicants respectfully submit that even if Litchfield et al. is taken to have a teaching that one of skill in the art would use to chose β -hydroxypropionaldehyde as an antibiotic of choice, there is no teaching in this reference or in the combination of Litchfield et al. with the other cited references which have various uses of L. fermentum, of the claimed invention including the step of selecting a Lactobacillus reuteri strain which produces β -hydroxypropionaldehyde under anaerobic conditions and in the presence of glycerol or glyceraldehyde, nor of combining this step a step of adding this

strain to food or using it as probiotic according to the claims pending herein.

In other words, even if all of these references are combined, there is no teaching or suggestion of the use of L. reuteri, the selection of any strains used producing an antibiotic under anaerobic conditions in the presence of glycerol or glyceraldehyde, that they produce β -hydroxypropionaldehyde under these or any conditions, that any single strain should or could be used, that there would be any efficacy in using a single strain, or that selection of a strain of a single species, L. reuteri, in particular, according to Applicants' claimed invention, could be done or would be useful. There is no teaching in any of these references nor in their combination that strains be selected on the basis of their production of β hydroxypropionaldehyde under the specified conditions.

Applicants therefore submit that claims 49 and 67-68 (replacing claims 56 and 57) are patentable under 35 U.S.C. §103 over Kawai et al., Yokokura et al., Sarra et al., Sobolov et al. and Litchfield et al.

In further support of the novelty and nonobviousness of Applicants' invention herein, Applicants hereby submit a copy of a chapter in a standard treatise on food preservatives, which discusses the importance of the invention of Applicants herein (pages 167-171) of Food Biopreservatives of Microbial Origin by B. Ray and M. Daeschel, CRC Press, 1992.

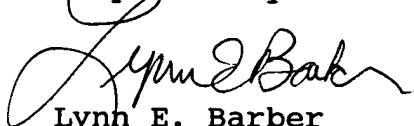
Conclusion

For all the foregoing reasons, claims 49 and 67-70 are submitted to be fully patentably distinguished over the cited references and in allowable condition. Favorable action is therefore requested.

The filing fee for this divisional application is separately submitted herein. It is therefore submitted that no additional fee required for the presentation of this preliminary Amendment. Any amounts which may be due for the presentation of this amendment should be charged to Deposit Account No. 15-0490 of Applicants' attorneys.

If any questions or issues remain, the resolution of which the Examiner feels would be advanced by a conference (telephonic or personal) with Applicants' attorney, the Examiner is invited to contact such attorney at the telephone number noted below.

Respectfully submitted,



Lynn E. Barber
Registration Number 31,734
Attorney for Applicants

Olive & Olive, P.A.
P.O. Box 2049
Durham, North Carolina 27702
(919) 683-5514

Enclosures:

Copies of the following documents filed in the parent application on March 16, 1994:

- (1) Affidavit of Ivan A. Casas-Perez
- (2) Copies of reviews
- (3) Ray and Daeschel reference
- (4) Copies of German papers

Probiotics: Intestinal inoculants for production animals

Using these preparations of live, naturally occurring microorganisms helps restore and maintain the proper balance of beneficial microflora in the intestinal tract during times of stress, disease, and following antibiotic therapy.

STEVEN M. FOX, MS, DVM
Microbial Genetics Division
Pioneer Hi-Bred International
Des Moines, Iowa 50131

FOR YEARS veterinarians have had feelings of ambivalence about using the bacterial and yeast preparations known as probiotics to improve the health and performance of food animals. Though most understand and accept the concept of replacing or supplementing the gut microbes with beneficial bacteria, their doubts concern the safety and efficacy of the probiotics available. Market research suggests that these doubts stem from unsuccessful experiences with early probiotic products, most of which simply did not work. Manufacturers have responded by researching bacteria selection, bacterial counts, stability, ability to track inoculated bacteria within the gut (to ensure that these bacteria have established residency), and directing products toward the applications that will result in the greatest efficacy.

Another reason for hesitancy to use probiotics among veterinarians is that some producers are reluctant to give up feeding antibiotics. But probiotics have, in fact, demonstrated efficacy as a substitute for feeding antibiotics. Two areas in which the intestinal inoculant effect of probiotics is strongly documented are in suppressing neonatal

scours and improving the growth of young or stressed animals. According to the growing database of research, such observations are similar across animal species.

Despite some negative perceptions, however, veterinarians are becoming increasingly aware of the benefits of probiotics. A survey of 225 randomly selected U.S. large-animal practitioners revealed that 60% either prescribed or dispensed probiotics for one or more species (including horses, dairy and beef cattle, and swine) in the 18 months preceding the survey.¹ Both users and nonusers said their awareness and interest in prescribing or dispensing probiotics had increased during the previous two years as more products and more information had become available.

This article will review the "probiotic hypothesis," the typical features of a probiotic, the proposed modes of action, and the safety and efficacy of these products.

What are probiotics?

Probiotics are bacterial (and yeast combination) preparations, most often lactic acid producing, that are administered orally or added to feeds. The most commonly used

TABLE 1
Common Probiotic Organisms

Lactic Acid Bacteria	Other Probiotic Organisms
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. toyoi</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>L. casei</i>	<i>Torulopsis</i>
<i>Streptococcus faecium</i>	<i>Bifidus bifidum</i>
<i>S. lactis</i>	
<i>S. thermophilus</i>	
<i>S. diacetilactis</i>	

probiotics are strains of the lactic acid bacteria (LAB) *Lactobacillus* and *Streptococcus*. Besides LAB, other microbial products that contain *Bacillus*, yeasts, enzymes, biomass, and other agents are also classified as probiotics. The most frequently used probiotic organisms are listed in Table 1; they may be used alone, in combination, or in association with other non-LAB. Table 2 lists brand-name LAB probiotics for which experimental results have been reported.²

The probiotic hypothesis postulates that if sufficient LAB can be introduced into the intestinal tract at a time of stress or disease (when the balance of intestinal flora favors pathogens) or at birth or after antibiotic treatment (when minimal lactic bacteria are present), then enteric microbial upsets can be minimized or overcome. During periods of low resistance, such as with stress, undesirable bacteria are able to proliferate. Maintaining "healthy" intestinal flora is critical during such unstable periods.

The effects of stress

After nearly five decades of re-

search on stress, an acceptable clinical definition still has not been established.³ Nevertheless, evoked stress can be nutritional, environmental, or emotional (anthropomorphic), ostensibly increasing the likelihood of disease of any kind, but especially intestinal disease.

When an animal is stressed experimentally, its intestinal flora changes relative to a decrease in the anaerobic components. This decrease might result from the decreased availability of substrate for anaerobic species. The amount of mucin (an energy source for anaerobic bacteria) secreted into the GI tract can be decreased by administering corticosteroids; and many investigators associate an increased release of endogenous corticosteroid with a stress response.³ If stress is of sufficient magnitude and chronicity to result in increased corticosteroid release and decreased mucin secretion, the number of anaerobic bacteria that use mucin would be reduced as well. Subsequently, the number of coliform bacteria increases greatly.

Stress appears to trigger both a change in the mechanisms regulat-

ing bacterial populations of the intestinal tract and quantitative and qualitative changes in fatty acid production. Many enteric pathogens belong to the family Enterobacteriaceae. Without metabolic fatty acid control, these bacteria can proliferate enough for successful attachment to a target cell site in the gut, causing diarrhea.⁴

Diarrhea is often an expression of stressful factors such as handling and shipping, changes in feed, cold or rapidly changing temperatures, crowded conditions, feces accumulation during prolonged pen occupancy, and pen mate changes. Diarrhea can severely compromise an animal's health and prolong its time to market weight.

Intestinal flora

The term "normal GI flora" is difficult to define. The gut microflora consists of organisms that permanently colonize the tract as well as those that are transient. (More than 400 strains of bacteria are estimated to occupy the monogastric mouse gut.) *Lactobacillus* spp have been isolated from the upper intestinal flora of ruminants, swine, fowl, and rodents.⁵

If a microorganism is to survive the continuous movement of gut contents along the intestinal tract, it must either multiply rapidly or attach itself to the gut wall. Once ingested, lactobacilli are said to "implant" within the GI tract. This may involve free association in the lumen or colonization of epithelial surfaces, either through adherence to structures on the surface or colonization of secretions (mucin) overlying the epithelial cells.⁶

High populations (10⁹ organ-

TABLE 2
Brand-name Probiotics for which Experimental Results
Have Been Reported in the Technical Literature

Components	Form	Trade Name	Manufacturer	Author
<i>L. acidophilus</i> , other <i>Lactobacillus</i> spp	Live dry	Probios®	Nulabs Division Pioneer Hi-Bred Intl. Portland, OR	Miles-1981 Pollmann-1980 Francis-1978 Goodling-1984 Damron-1981 Wells/Mason- 1980
<i>L. acidophilus</i>	Inactive liquid	Culbac®	Trans Agra Corp., Memphis, TN	Hargis-1978 Noland-1978 Hoyt-1980 Goodling-1984 Pollmann-1980
<i>S. faecium</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i>	Live dry	Feed-mate 68	Anchor Labs St. Joseph, MO	Pollmann-1980 Maxwell-1983
<i>Lactobacillus</i> (species not indicated)	Live liquid	Biomax 40™		Watkins-1984
<i>Streptococcus</i> fermentation residue, whey, corn extract, corn meal residue, solubles and solids	Inactive dry	Fermacto 500	Borden Chemical Co. Norfolk, VA	Change-1970 Potter-1972, 1984
<i>Streptococcus</i> meal extract, penicillin meal, beer yeast, residue solids and solubles	Inactive dry	Biofac	Peter Hand, Inc. Waukegan, IL	Buenrostro/ Kratzer-1983
<i>L. acidophilus</i>	Live liquid	Strain 40	Milwaukee, WI	Buenrostro/ Kratzer-1983
<i>Lactobacillus</i> fermentation products	Inactive dry	Baciferm	Commercial Solvents Corp.	Goodling-1984
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Torulopsis</i> , <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>	Live dry	PrimaLac	Star Labs St. Joseph, MO	Maxwell-1983
<i>S. faecium</i> , family M74	Live liquid	Lactiferm	AB Medipharma Sweden	Burgstaller-1983, 1985
<i>Bacillus toyoi</i>	Live spores, dry	Toyocorin	Toyo Joso Co. Ltd. Tokyo, Japan	Shimura-1979

isms/g of mucosa) of *Lactobacillus* spp can be cultured and observed on the squamous epithelium of the nonsecreting portions of the swine stomach⁷ and from the crop of chickens.⁸ In the chicken crop, only lactobacilli have been found attached to the epithelium, but lactobacilli and streptococci have been detected in the pig stomach.⁹

Attachment of bacteria to the squamous epithelium shows a high degree of specificity. In the chicken, only strains of lactobacilli isolated from chickens and other birds can adhere to epithelial cells of the crop.¹⁰ In similar tests with pigs, when pig cells and *Lactobacillus* and *Streptococcus* spp isolated from other animals were given orally, only isolates from a pig, a wild boar, and one *Lactobacillus* strain from a chicken adhered to the gastric epithelium.^{11,12}

If the entire pars esophagea of the pig were covered with a confluent layer of bacteria, one-cell deep (each bacterium with a cross-sectional area of 1 square millimicron) attached to the epithelium, it would have about 10^8 bacteria attached. The stratified squamous epithelium that composes the pars esophagea is continuously desquamating, releasing cells with attached bacteria into the lumen to inoculate the food. Thus, these attached bacteria could prove to be an important natural mechanism for regulating the composition of the stomach microflora by supplying a continuous inoculum of specific lactobacilli and streptococci to the food as it enters the stomach. This would ensure the dominance of lactic acid bacteria in the gastric chyme.

Researchers theorize that the

natural flora of the pig is protective. Depending on the immune status of the animal and the bacterial challenge, it may be protective or it may need probiotic augmentation. The natural protective mechanism of the pig is analogous to that of the chicken, in which the crop is also lined with stratified squamous epithelium and has large numbers of lactobacilli attached to it, which suppresses growth of *E. coli*.

The chicken differs from mammals in not having a period during which it suckles the dam and lives solely on milk. It is independent at hatching and immediately ingests water and solid food. Under natural conditions, hen excrement is the major source of inoculant intestinal bacteria for the newly hatched chick, but under artificial rearing conditions, food is the main source of gut bacteria. The speed with which the gut becomes inoculated with a given bacteria depends on environmental contamination and probiotic administration.

In contrast to the chicken, the piglet's intimate contact with the sow is the source of intestinal bacteria, and gut microflora is rapidly established. Researchers have found that *E. coli*, streptococci, and lactobacilli are detectable in the gut within three hours of birth.¹³ Populations of the three genera were found to peak by the end of the first day, but thereafter the number of *E. coli* and streptococci declined in the stomach and small intestine.

Compared with neonatal pigs and calves, the chicken is relatively resistant to *E. coli* enteric infections. It is tempting to relate this to the presence of an inhibitory *Lacto-*

bacillus flora in the anterior chicken gut. When lactobacilli are eliminated from the chicken's crop by penicillin, the increase in *E. coli* and its subsequent suppression by lactobacilli provide evidence that lactobacilli are directly involved in preventing growth of *E. coli* in the crop *in vivo*.¹⁴ The ability of lactobacilli to adhere to crop epithelial cells is of central importance in establishing this balance.

The homeostatic processes involved in maintaining the stability of the GI ecosystem prevent transient microbial species from colonizing the system.¹⁵ Transients, many of them potential pathogens, constantly enter the system via food, water, and other ingesta. They usually do not persist long in the undisturbed system, but may inhabit a disturbed tract. Such organisms are often recognized pathogens such as enteropathogenic strains of *E. coli*.

Studies in the 1970's showed that adding *Lactobacillus acidophilus* to the food or drinking water of people changed their intestinal microflora.^{15,16} Other reports confirm that the number of coliform bacteria in the feces of calves fed whole milk containing *L. acidophilus* decreased;¹⁷ that adding *L. acidophilus* to the diet of young piglets decreased the number of *E. coli* in the digestive tract;¹⁸ and that supplementing poultry feeds with these bacteria had beneficial effects.^{14,19} As long as active bacteria are administered through feed or water, there appears to be no question that the microbial population can be shifted away from toxin-forming *E. coli* and toward beneficial lactic acid producers.

Continued

Antibiotics and probiotics

Chemotherapeutics in general and antibiotics in particular have been used as feed additives for years. Unfortunately, these nonselective drugs kill nonpathogens as well as pathogens. Because certain strains of bacteria become resistant to antibiotics, the positive effect of antibiotics is dynamic. There is also a growing consumer demand to ban antibiotics and other chemotherapeutic agents as feed additives because of their connection with residues in food and transferable antibiotic resistance through bacterial resistance (R) factor.²⁰

The extensive use of antibiotics and other agents in treating bacterial enteritis is somewhat paradoxical. Although these agents might be successful initially, their benefits are often nullified by postantibiotic diarrhea. Diarrhea occurs because antibiotics suppress the normal intestinal bacteria and allow abnormal overgrowth of pathogens, which cause disease. By removing the producers of volatile fatty acids, antimicrobial agents also remove an important restraint on the growth of yeast and fungi, making them more invasive.²¹ Although the pathogenesis of antibiotic-associated diarrhea is poorly understood, studies evaluating gastrointestinal and fecal composition during antibiotic therapy have demonstrated a decrease or disappearance of *L. acidophilus*.²²

Regarding the efficacy of antibiotics as growth promotants, any improvement in growth rate and feed efficiency is inversely related to the performance level of untreated control groups. This suggests that growth promotants work to

palliate the depressing effects of unbalanced diets, microbial disease, poor environment, and other stressful conditions, rather than actually promoting growth. The discovery that antibiotics included in the feed of chickens and pigs would improve their growth rate implies the existence of an intestinal microflora that depresses growth. This observation was confirmed by demonstrating that antibiotics added to the diet of germ-free chicks did not increase their growth rate.²³⁻²⁵

A number of trials have been conducted contrasting the effects of feeding probiotics vs. antibiotics; the results of selected studies are listed in Table 3. Probiotics offer the same benefits in animals as low-dose antibiotics when used as growth promotants. In addition, they aid in feed conversion, and in some countries are used as prophylaxis against enteritis.

Efficacy and safety

The rate of daily weight gain and feed conversion efficiency in food animals depend on a variety of factors, including genetics, diet, husbandry, and the health of the animal. Health is probably the most important because almost all disease inevitably results in a degree of metabolic inefficiency. Disease affects the animal's performance by depressing the rate of growth, either through low-grade toxicity or impaired physiologic or metabolic activities. How much the performance is depressed by subclinical or chronic disease is variable.

Animal performance in response to feeding probiotics is influenced by the inoculant level fed, the animal species tested, and the animal's

stage of maturity, plane of production, level of stress, and rearing environment. Because of this wide spectrum of variables, it is not surprising that there is a broad range of response to probiotics. What is noteworthy from a literature review is not so much the lack of response, but the plethora of positive responses spanning a huge range of experimental protocols, animal species, geography, and products tested. The following sections discuss the efficacy of probiotics in selected species.

Pigs

Colibacillosis is a significant disease problem in pigs less than one week old and again at weaning.²⁶ Studies conducted with several litters of pigs have demonstrated that bottle feeding a *L. lactis* concentrate to neonates significantly suppressed fecal coliform counts.²⁷ Intestinal tissue homogenates from these *Lactobacillus*-fed pigs had higher numbers of lactobacilli than did scouring or control pigs, suggesting the lactobacilli were becoming established, thereby reducing the colonization by *E. coli*.

In the normal flora of healthy nonscouring pigs in these studies, the *Lactobacillus* counts were greater than the coliform counts. In contrast, the coliform counts in scouring animals were invariably greater than the *Lactobacillus* counts. The *Lactobacillus* isolated from tissue homogenates of treated animals resembled the *Lactobacillus* that was fed, both biochemically and serologically (fluorescent antibody technique). It appeared that the *L. lactis* colonized the

Text continues on page 824.

TABLE 3
The Effects of Probiotic vs. Antibiotic Administration

Species	Weight (kg)	Antibiotic (Advantage)	Probiotic (Advantage)
Calf ¹	NI	80 mg virginamycin/kg milk (3.8 medical treatments/group)*	1.5 g <i>S. faecium</i> M74/kg milk replacer (3.1 medical treatments/group)
Calf ²	NI (5-15 weeks old)	40 mg avoparcin/kg feed	20 mg <i>S. faecium</i> /kg (16% scours reduction)
Calf ³	NI	80 ppm bacitracin zinc (1.722 FE; 1,236 g ADG)**	10 ⁵ <i>S. faecium</i> /g milk replacer (1.713 FE; 1,229 g ADG)
Calf ⁴	62-185	100 ppm spiramycin + 25 ppm carbadox	40 ppm <i>S. faecium</i> 68 (+ 8.4% growth)
Calf ⁵	NI	80 ppm bacitracin zinc	10 ppm <i>Lactobacillus</i> culture (+ 4.8% weight gain and 54% decrease in duration of diarrhea)
Calf ⁶	65-170	Bacitracin	<i>S. faecium</i> 68 (Equal FE, ADG, and slaughter weight)
Pig ⁷	NI	10 ppm virginiamycin (3.18 kg feed/kg weight gain) Avoparcin (3.06 kg feed/kg weight gain)	<i>S. faecium</i> (3.10 kg feed/kg weight gain) <i>S. faecium</i> (3.00 kg feed/kg weight gain)
Pig ⁸	20-90	40 ppm Tylan [®] (0.725 kg/day growth)	1 kg Pronifer [®] /ton of feed (0.795 kg/day growth)
Pig ⁹	7 (Neonates)	Flavomycin	Probios [®] (Equal effect on incidence and severity of scours)
Pig ¹⁰	6-30	6 ppm flavomycin	15 ppm <i>S. faecium</i> 68 (+ 3.2% weight gain)

*Control = 3.3 medical treatments/group. (This parameter refers to the number of calves removed from the study that required treatment for any disease.)

**Control = 1.816 FE; 1,156 g ADG.

¹Hefel, H.: Kalberaufzucht mit Virginiamycin und Lactiferm im Milchaustauscher. Aulendorf: Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Viehhaltung, 1980.

²Kirchgessner, M.: Report of a Trial of the Effect of Microferm on the Nutritional Physiology of Young Calves. Weihenstephan: Technische Universität München, Institut für Ernährungsphysiologie, 1985.

³Burgstaller, G. et al: Zum Einsatz von Lactiferm in der Kalbermast. *Achtungskunde* 55: 48-54; 1983.

⁴Research results: J. Joosten's, Horst, Limburg, Netherlands, 1979.

⁵Research results: J. Joosten's, Horst, Limburg, Netherlands, 1977.

⁶Burgstaller, G. et al: On the Addition of *Lactobacillus* (*Streptococcus faecium* SF-68) in Milk-substitute Feeds for Veal Calves. *Zuchtungskunde* (Breeding Theory) 56:156-162; 1984.

⁷Internal Reports of Field Trials Involving Treatment of Pigs with *S. faecium*. Swedish Farmers Association, 1984 and 1985.

⁸Probiotics Show Promise. *Farmers Weekly*: 42; April 24, 1987.

⁹Sutherland, H.K.; Miller, J.K.: Report on a Trial to Determine the Effect of Probiotic Cultures Administered Orally to Sows and Piglets from Birth to 21 Days. Edinburgh School of Agriculture, Jan. 1986.

¹⁰Research results: J. Joosten's, Horst, Limburg, Netherlands, 1982.

NI = Not indicated in the report.

TABLE 4
Performance of Probiotic-Treated Animals

Species*	Treatment	Performance of Treated vs. Control Animals
Pig ^a	<i>L. acidophilus</i>	6.3% increase in survival rate
Pig ²⁹	<i>S. faecium</i>	15.6% decrease in mortality
Pig ^b	<i>S. faecium</i> 68	53% decrease in mortality and 10% increase in weight
Pig ³²	Probios ^c	Sow and piglets treated: 20% decrease in scours; sow treated only: 10% decrease in scours
Pig ³¹	Probios	Sow and piglets treated: 80% decrease in scours; piglets treated only: 29% decrease in scours
Pig ³³	<i>S. faecium</i>	23% decrease in scours; 50% decrease in mastitis, metritis, and agalactia
Pig ^c	<i>S. faecium</i> 68	64.3% decrease in scours
Pig ^d	Probios	11 to 19% advantage in live weight gains
Cattle ^e	Probios	4.88% improvement in ADG; 7.57% improvement in FE
Cattle ^f	Probios	2.84% advantage in live weight gains; 3.23% advantage in FE
Cattle ^g	Probios	9.52% advantage in live weight gains; 4.49% advantage in FE
Chickens ³⁹	<i>S. faecium</i> M74	3.53% advantage in FE**
Chickens ⁴⁰	<i>S. faecium</i>	4% improved feed utilization
Chickens ^h	Probios	4.7% improved FE

*Superscript numbers refer to references listed at the end of this article.

**As compared to chickens treated with Nitrovin.

^aWatson, P.: *Feedstuffs*; June 15, 1987.

^bResearch conducted in Nebraska for J. Joosten's, Horst, Limburg, Netherlands.

^cResearch conducted at the University of Belgrad for J. Joosten's, Horst, Limburg, Netherlands.

^dAbilay, T.A.: Probios Farm Demo in San Pablo City, Philippines, 1987. Microbial Genetics Division, Pioneer Hi-Bred International, Des Moines, Iowa.

^eParker, R.B.; Crawford, J.S.: Alternatives to Antibiotics. *Proc. 13th Ann. Northwest Anim. Nutr. Conf.*, Vancouver, B.C., Canada, Nov. 1978.

^fInternational Summary of Animal Performance: Probiocin® Brand Microbial Products: Oral Gel and Granules for Ruminants, 1984-85.

^gMicrobial Genetics Division, Pioneer Hi-Bred International, Des Moines, Iowa.

^hCrawford, J.S.: Probiotics in Animal Nutrition. Arkansas Nutrition Conference, 1979.

small intestine and reduced colonization by *E. coli*. Inability to produce symptoms of diarrhea, even 72 hours after a challenge dose of *E. coli*, indicated that *L. lactis* played a protective role.²⁷

In another study, nine gnotobiotic pigs were fed *Streptococcus faecium* to prevent colibacillosis; nine other pigs served as untreated controls.²⁶ Three strains of *E. coli* were then used to challenge the pigs. With *E. coli* strain O:K103,987 PNM, the pigs fed *S. faecium* before the challenge exposure exhibited less severe diarrhea, recovered earlier, and had better weight gains than did the control pigs.

The other two *E. coli* strains

(0157:K88ac:H19 and 08:K87,K88ab:H19) were more virulent and even pigs fed *S. faecium* and challenged with these two strains developed mild diarrhea. However, none of the pigs died and they continued to eat well and gain weight. Pigs given only these *E. coli* strains developed severe diarrhea and lost weight; five of eight of these pigs died. Bacterial counts of *E. coli* and *S. faecium* from three areas of the small intestine and the cecum were comparable among the experimental groups fed *S. faecium* and *E. coli*. Histopathologic examinations demonstrated abundant *S. faecium* colonization of the intestinal tract. It appeared that *S. faecium* re-

duced the toxic effects of *E. coli* and prevented generalized infection and death.

Marked improvements in the mortality rate of neonatal pigs have been attributed to probiotics. *Lactobacillus*-treated piglets have shown as much as a 53% reduction in mortality over untreated controls under normal production conditions (Table 4).²⁸⁻³⁰ When compared to untreated controls, probiotic-treated piglets have shown as much as a 64% reduction in scours, and as much as an 80% reduction when both the sow and piglet were treated under normal production conditions.³¹⁻³⁴

The most consistent positive re-

sponse to probiotics occurs when they are administered to neonatal and young pigs. The value of feeding these products to nonstressed growing or finishing pigs has yet to be supported. Because these animals apparently experience less stress and have greater immunocompetence and established gut microflora, the infusion of additional bacteria yields less demonstrable results.

Cattle

In one study, more lactobacilli and fewer coliforms were found in the small intestine of calves fed pasteurized whole milk containing *L. acidophilus* than in nontreated control calves.³⁵ Also, in another study a 36.9% reduction in calf scours was attributed to the use of a *Lactobacillus* inoculant.³⁶

Probiotics modulate stress associated with intensive production practices, i.e. light-weight calves entering the feedlot. Under feedlot conditions, a 13.2% increase in average daily gain, a 6.3% increase in feed efficiency, and a 27.7% decrease in morbidity have been observed in cattle given Probios® (Pioneer Hi-Bred), a LAB combination, as compared with untreated cattle.³⁷ With oral administration at processing and top dressing the feed ration of incoming cattle for five to 30 days, morbidity was reduced, average daily gain was increased, and feed to gain ratio was lowered (Table 5).³⁸

Chickens

Initial dosing with *L. acidophilus* has been shown to reduce mortality in chicks challenged with *E. coli*. Also, continued dosing with *L.*

	No. of Trials**	Control Cattle	Probiotic-treated Cattle	Advantage	P Values***
Performance					
Average daily gain (lb)	38	1.67	1.89	+ 13.2%	0.001
Feed consumption (lb)	28	10.96	11.23	+ 2.5%	0.06
Feed/gain (lb)	28	6.93	6.49	+ 6.3%	0.06
Health					
Morbidity (%)	39	20.26	14.64	+ 27.7%	0.005
Mortality (%)	40	0.59	0.47	—	NS

*Cattle were given Probios® Oral Gel (Bovine One) at processing, Probios® Feed Granules (180R) in their feed, or both products.
 **Each trial lasted an average of 30 days.
 ***Statistical analysis conducted using paired t-test.
 NS = Not significant.

Treatment**	Body Weight (lb)	Feed Conversion	Percent Mortality
Three-week-old Broilers			
Control	1.63 (± 0.03)***	1.55 (± 0.09)	4.0 (± 2.5)
Treated	1.65 (± 0.03)	1.54 (± 0.04)	1.0 (± 1.7)
Six-week-old Broilers			
Control	4.59 (± 0.12)	1.86 (± 0.03)	8.0 (± 5.0)
Treated	4.65 (± 0.16)	1.84 (± 0.04)	1.7 (± 1.7)

*Probios® intestinal inoculant (Pioneer Hi-Bred International).
 **Microbial inoculant was administered in the drinking water of the chicks the first three days, then in the feed from four to 42 days. The study involved 900 broilers.
 ***Standard deviations are in parentheses.

acidophilus lowers the pH of the crop, cecum, and rectum in chicks initially given *L. acidophilus* or *E. coli*, which demonstrates *L. acidophilus* can compete with *E. coli* in the gut of gnotobiotic chicks. Chickens fed probiotics have shown a 4% improvement in feed efficien-

cy.^{39,40} In a recent study, Probios produced a 1.3%, 1%, and 91% improvement in broiler weight gain, feed conversion, and mortality, respectively (Table 6).⁴¹

Other species

For wean-stressed lambs,

TABLE 7
Influence of a Probiotic* on Lambs

	Oral Gel Treatment		Percent Improvement
	Placebo	Probiotic*	
Number of lambs	16	16	
Day 14			
Daily weight gain (g)**	116.7	145.5	24.7
Daily dry matter intake (g)	551.6	571.9	3.7
Feed efficiency	4.73	3.93	17.0
Number of morbid lambs treated	9	0	
Day 28			
Daily weight gain (g)**	131.2	139.6	6.4
Daily dry matter intake (g)	703.9	747.0	6.1
Feed efficiency	5.37	5.35	0.3
Number of morbid lambs treated	5	1	
Total number of treatments of morbid lambs	16***	1	

*Probios Oral Gel (Pioneer Hi-Bred International).

**Adjusted for average daily gain from birth to weaning.

***Some morbid lambs were treated more than one time.

treatment with Probios intestinal inoculant improved morbidity by 93% and average daily gains by 6 to 24% (Table 7).⁴² And when newborn to 30-day-old foals were treated with Probios, both the incidence and severity of diarrhea were markedly reduced. Further, if diarrhea occurred, its duration in the treated foals was shortened considerably compared with the untreated controls.⁴³

Intensive use in veterinary medicine and a double-blind controlled clinical trial in children have confirmed that *S. faecium* is effective as a biological preparation for treating diarrheic disturbances.⁴⁴

Safety

Lactobacilli have been used for ages in the commercial preparation of dairy, grain, fish and meat prod-

ucts, pickled vegetables, sauerkraut, silage, and sourdough. They are part of the normal flora of plants and animals, particularly in the mouth, intestinal tract, and vagina of many warm-blooded animals, including human beings. Pathogenicity is rare, making their use safe to the host, environment, and handler.

It should be stressed that all probiotics are not the same. An effective product must possess several attributes:

1. The proper viable bacterial components must be present in proper numbers for an effective symbiotic response. Studies with mice have shown that there is an inoculant level of optimal response,⁴⁵ above which decreased performance results. A domi-

nant commercial factor governing microbial viability in the feed industry is the typical pellet mill operation. Temperatures in this phase of production consistently range between 160 F to 180 F, far above the maximum tolerance for *Lactobacillus* species (113 F to 118 F). Therefore, *Lactobacillus* spp incorporated into feeds before pellet extrusion are probably nonviable when fed. Heat is less a problem for spore formers.

2. The bacteria must be capable of reaching and colonizing the intestinal tract, which implies that they must be resistant to gastric acid and bile.
3. Once ingested, the bacteria must be quickly activated, have a high specific growth rate, and produce acid rapidly (which implies they have an anti-*E. coli* effect).
4. An acceptable shelf-life must be guaranteed.
5. Once the bacteria are administered, they must be able to be tracked within their ecological habitat (i.e. plasmid profiling⁴⁶).

Modes of action

Although the probiotic concept has been recognized for many years, the absolute mode of action has been elusive. There has been a long-standing belief that under certain circumstances LAB may prevent or ameliorate coliform-associated diarrheas. Several explanations¹⁵ have been suggested, including production of anti-*E. coli* substances,^{47,48} synthesis of lactate with concomitant reduction in intestinal pH,⁴⁹⁻⁵¹ adhesion to the gut wall preventing colonization by pathogens,^{52,53} endotoxin detoxifi-

cation,⁵⁴ and prevention of toxic amine synthesis.⁵⁵

Antibiotic production

Lactobacilli have been reported to produce various types of antibiotics. *Lactobacillus acidophilus* produces acidophilin, lactocidin,^{47,56} and acidolin,⁵⁷ and *L. plantarum* produces lactolin.⁵⁸ Nisin and diplococcin are among the antimetabolites produced by streptococci.^{59,60} Additionally, some of the lactobacilli produce sufficient hydrogen peroxide to inhibit various microorganisms.^{61,62}

Lactobacillus antibiotic metabolites acidophilin, acidolin, lactobacillin, and lactocidin have demonstrated an *in vitro* inhibitory activity against *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Vibrio* species and enteropathogenic *E. coli*.⁶³

LAB produce organic acids such as acetic and lactic acid, which also inhibit growth of many pathogenic Gram-negative organisms.⁶⁴ The long-held speculation is that this antimicrobial activity may be due to low oxidation-reduction potentials (lowering the oxygen available to pathogens) and low pH maintained within the intestine through LAB metabolism.^{15,65}

In one study, the pH of multiple areas of intestine was tested from pigs treated with *S. faecium* and compared to untreated controls. The pH was reduced from 7.3 to 6.9 in the mid-jejunum; however, in the duodenum, no reduction in pH was observed. The content of the duodenum was slightly acidic (pH 6.0) in both the treated and the untreated group of animals.⁶⁶

Competitive antagonism

The normal microbial flora of the GI tract acts as a host defensive barrier either by making the target epithelial cell unavailable to pathogens or by creating an environment detrimental to pathogens. Stated differently, if the normal inhabitants of the GI tract are secure in their niche, then potentially pathogenic bacteria may not be able to compete successfully for an attachment site. Thus, anything that upsets the balance between host and normal flora may give a pathogen easier access to its target cell or allow it to multiply so that competition for target cells is easier.⁴

In one *in vitro* study, colonization by an invading strain of *Klebsiella pneumoniae* was prevented by the presence of an established culture of *L. acidophilus*, principally because the medium's pH was lowered to a point that was incompatible with *Klebsiella* growth. However, when the population density of *L. acidophilus* was reduced by the presence of a sufficient concentration of linoleic acid, the invading *K. pneumoniae* successfully colonized the system and once established, suppressed the growth of *L. acidophilus* — indicating that Gram-positive enteric bacteria suppress coliform growth and that this effect can be reversed by the presence of linoleic acid.⁶⁷ (Long-chain unsaturated fatty acids have an inhibitory effect on Gram-positive bacteria.)

Through the constant infusion of "friendly" organisms in the diet, colonization of the gastrointestinal tract by pathogenic organisms can be altered, improving health and life expectancy. This idea of "com-

petitive exclusion" led to the practice of microbial inoculation. Many examples of this phenomenon have been reported.⁶⁸⁻⁷⁰

Immunostimulation

The most recently advanced and most provocative mode of action attributed to probiotics is immunostimulation. The normal microbial flora of an animal has a significant impact on the body's immune system. The numbers of intraepithelial lymphocytes, plasma cells, and Peyer's patches are lower in germ-free animals than in conventional animals.⁷¹

Several lactic acid bacteria in cultured dairy products given either orally or intraperitoneally have been ascribed antitumor activity and immunostimulation against experimental malignant tumors in mice, rats, and guinea pigs.⁷²⁻⁷⁶ Further, the tumor-suppressing effect of lactobacilli is not attributable to the direct cytotoxicity of these organisms, but to some host-mediated response.

Small quantities of yogurt added to human peripheral blood lymphocyte cultures (stimulated by the mitogen concanavalin A) significantly potentiates the production of gamma interferon, γ -IFN.⁷⁷ This cytokine is endowed with anti-infective, antitumoral, and immunoregulating properties; it is able to activate natural killer cells, regulate antibody production, and stimulate antigen-specific helper T cells through an increased expression in the DR (activation) determinant on macrophages.⁷⁸

In one study, Swiss mice were given *L. acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* orally and in-

traperitoneally.⁷⁹ Both of these LAB significantly enhanced the enzymatic and phagocytic activity of peritoneal macrophages compared with controls and accelerated the phagocytic function of the reticulo-endothelial system as revealed by carbon clearance test. The activated macrophages and lymphocytes produced the same increase in the immune response whether the bacteria were administered orally or intraperitoneally.

Conclusion

Probiotics are *not* an alternative to antibiotic treatment of acute diseases and should not be considered a "wonder medicine" against any specific disorder. Probiotics do aid feed conversion and in some countries are used prophylactically against enteritis. In the truest sense they are not growth promoters, but rather "growth permit- tants," allowing the host to best express its genetic potential.

Research in Sweden has demonstrated that feeding probiotics to production animals has the same beneficial effect as low-dose antibiotics used as growth promoters. Feeding low levels of antibiotics is a "security blanket" difficult to abandon, but there is a strong international consumer voice critical of this practice. As more negative side effects of feeding food animals low-dose antibiotics are observed, the demand for probiotics should rise. It is timely for veterinarians to evaluate the role of probiotics in the event that antibiotics are banned. As data increase to support the efficacy of probiotics during specific phases of production, the best management scheme may

be to incorporate both probiotics and antibiotics, depending on the phase of rearing.

REFERENCES

1. U.S. Veterinary Study on Probiotics. *Anim. Health & Nutr.* 12:13; Oct. 1985.
2. Tuschy, D.: The Use of "Probiotics" for Increasing Productivity in Animal Nutrition. *Anim. Nutr.* 14:157-178; 1986.
3. Moberg, G.P.: Colloquium on Recognition and Alleviation of Animal Pain and Distress: Problems in Defining Stress and Distress in Animals. *JAVMA* 191:1207-1211; 1987.
4. Hirsch, D.C.: Microflora, Mucosa and Immunity: Disruption of the Normal Microflora. *Veterinary Gastroenterology* (N.V. Anderson, ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., 1980; p 208.
5. Savage, D.C.: Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Ann. Rev. Micro.* 31:107-133; 1977.
6. Savage, D.C.: Introduction to Mechanisms of Association of Indigenous Microbes. *Amer. J. Clin. Nutr.* 32:113-118; 1979.
7. Fuller, R. et al: Bacteria Associated with the Gastric Epithelium of Neonatal Pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:582-591; 1978.
8. Fuller, R.; Turvey, A.: Bacteria Associated with the Intestinal Wall of the Fowl (*Gallus domesticus*). *J. Appl. Bacteriol.* 34:617-622; 1971.
9. Barrow, P.S. et al: Bacteria Associated with the Gastric Epithelium of Neonatal Pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:590; 1978.
10. Fuller, R.: Ecological Studies on the *Lactobacillus* Flora Associated with the Crop Epithelium of the Fowl. *J. Appl. Bacteriol.* 36:131-139; 1973.
11. Barrow, P.A. et al: The Attachment of Bacteria to the Gastric Epithelium of the Pig and Its Importance in the Microecology of the Intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 48:147-154; 1980.
12. Wesney, E.; Tannock, G.W.: Association of Rat, Pig and Fowl Biotypes of *Lactobacilli* with the Stomach of Gnotobiotic Mice. *Microbiol. Ecol.* 5:35-42; 1979.
13. Smith, H.W.: The Development of the Flora of the Alimentary Tract in Young Animals. *J. Path. Bacteriol.* 90:495-513; 1965.
14. Fuller, R.: The Importance of *Lactobacilli* in Maintaining Normal Microbial Balance in the Crop. *Brit. Poult. Sci.* 18:85-94; 1977.
15. Sandine, W.E. et al: Lactic Acid Bacteria in Food and Health: A Review with Special Reference to Enteropathogenic *Escherichia coli* as Well as Certain Enteric Diseases and Treatment with Antibiotics and *Lactobacilli*. *J. Milk Food Tech.* 35:691; 1972.
16. Sheck, M.L.: Interactions Among *Lactobacilli* and Man. *J. Dairy Sci.* 59:338; 1976.
17. Ellinger, D.K. et al: Influence of Feeding Fermented Colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on Fecal Flora and Selected Blood Parameters of Young Dairy Calves. *J. Dairy Sci.* 61:126; 1978.
18. Muralidhara, K.S. et al: Effect of Feeding *Lactobacilli* on the Coliform and *Lactobacillus* Flora of Intestinal Tissue and Feces from Piglets. *J. Food Protect.* 40:288; 1977.
19. Francis, D.: Interrelationship of *Lactobacillus* and Zinc Bacitracin in the Diets of Turkey Poults. *Poultry Sci.* 57:1687; 1978.
20. Spika, J.S. et al: Chloramphenicol Resistant *Salmonella newport* Traced Through Hamburger to Dairy Farms. *N. Engl. J. Med.* 316:565; 1987.
21. Hirsch, D.: Microflora, Mucosa and Immunity, Disruption of the Normal Microflora. *Veterinary Gastroenterology* (N.V. Anderson, ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., 1980; p 207.
22. Goltz, V. et al: Prophylaxis Against Ampicillin-Associated Diarrhea with a *Lactobacillus* Preparation. *Am. J. Hosp. Pharm.* 36:754-757; 1979.
23. Whitehill, A.R. et al: Stimulatory Effect of Aureomycin on the Growth of Chicks. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 74:11-13; 1950.
24. Jukes, T.H. et al: Growth-promoting Effect of Aureomycin on Pigs. *Arch. Biochem.* 26:324-325; 1950.
25. Coates, M.E. et al: A Comparison of the Growth of Chicks in the Gustafsson Germfree Apparatus and in a Conventional Environment With and Without Dietary Supplements of Penicillin. *Brit. J. Nutr.* 17:141-150; 1963.
26. Underdahl, N.R. et al: Effect of *Streptococcus faecium* C-68 in Control of *E. coli* Induced Diarrhea in Gnotobiotic Pigs. *AJVR* 43:2227-2232; 1982.
27. Muralidhara, K.S. et al: Effect of Feeding *Lactobacilli* on the Coliform and *Lactobacilli* Flora of Intestinal Tissue and Faeces from Piglets. *J. Milk Food Tech.* 40(5):288; 1977.
28. Phelps, A.: Probiotics Boost Piglet Survival Rate. *Feedstuffs*:27; June 15, 1987.
29. Moen, J.: *Streptococcus faecium* mot Spedgrisdair. *Norsk Veterinartidskrift* 94:629-631; 1982.
30. Research results: J. Joosten's, Horst, Limburg, Netherlands.
31. Morill, A.: Effect of Lactic Acid-Producing Bacteria on Diarrheas of the Suckling Pig. 9th Congress IPVS, Barcelona, Spain, July 1986.
32. Sutherland, H.K.; Miller, J.K.: Report on a Trial to Determine the Effects of Probiotic Cultures Administered to Sows and Piglets on Litter Performance from Birth to 21 Days. Edinburgh School of Agriculture, 1986.
33. Internal Report of a Field Trial with Pigs at the Swedish Farmers Association. Swedish Farmers Association, 1985.
34. Research results: J. Joosten's, Horst, Limburg, Netherlands.
35. Gilliland, S.E. et al: Comparison of Two Strains of *Lactobacillus acidophilus* as Dietary Adjuncts for Young Calves. *J. Dairy Sci.* 63:964; 1980.
36. Tournot, J. et al: New Approach to the Prevention of Neonatal Scouring in Calves and Piglets By Biological Competition. Paper presented at Symposium se la Nutrition des Jeunes Animaux, Paris, 1976.
37. Wren, W.B.: Summary of the Effect of Probiotic Products on the Performance and Health of Incoming Feedlot Cattle. Microbial Genetics Division, Pioneer Hi-Bred International, Des Moines, Iowa, 1987.
38. Wren B.: Probiotics — Fact or Fiction. *Large Anim. Vet.* 28-30; Nov./Dec. 1987.
39. Kumprecht, L. et al: Practical Trial with the Microbiotic Preparation Lactiterm in the Feeding of Broiler Chickens. Krmivarsvi a Sluzby, 1985.
40. Kirchgessner, M.: Report of the Effect of Microterm on the Nutritional Physiology of Broiler Chickens. Weihenstephan: Technische Universität

- Munchen, Institut für Ernährungsphysiologie, 1985.
41. Dennis, S. Mean Body Weight, Feed Conversion, and Percent Mortality of Broilers Treated with a Microbial Inoculant. Microbial Genetics Division, Pioneer Hi-Bred International, Des Moines, Iowa, 1987.
 42. Pond, K.R.; Goode, L. The Evaluation of Probiotics for Wean-stressed Lambs. Microbial Genetics Division, Pioneer Hi-Bred International, Des Moines, Iowa, 1985.
 43. Asquith, R.L. et al. Studies on the Performance of a Viable Microbial Oral Paste and Gel in Reducing the Incidence and Severity of Neonatal Diarrhea. *Fla. Agri. Exp. Sta. Res. Rep. AL-1983-7*, Nov. 1987.
 44. Lewenstein, A. et al. Biological Properties of SI-68 *Streptococcus faecium* — A New Approach for the Treatment of Diarrheal Diseases. *Curr. Therap. Res.* 26:979, 1979.
 45. Dennis, S. The Effects of *Lactobacillus* and *Streptococcus* on the Growth and Microflora of Stressed Mice. *Ann. Mtg. Amer. Soc. Microbiol.* Iowa City, Iowa, Nov. 7, 1987.
 46. Hill, H.A.; Hill, J.E. The Value of Plasmid Profiling in Monitoring *Lactobacillus plantarum* in Silage Fermentation. *Curr. Microbiol.* 13:91-94, 1986.
 47. Vincent, J.G. et al. Anti-bacterial Activity Associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* 78:477-484, 1959.
 48. Reddy, G.V.; Shahani, K.M. Isolation of an Antibiotic from *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 54:748, 1971.
 49. Burnett, G.S.; Hanna, J. Effect of Dietary Calcium Lactate and Lactic Acid on Faecal *Escherichia coli* Counts in Pigs. *Nature* 197:815, 1963.
 50. White, F. et al. Stomach Function in Relation to a Scour Syndrome in the Piglet. *Brit. J. Nutr.* 23:847-858, 1969.
 51. Herrick, J.B. Therapeutic Nutrition Using *Lactobacillus* Species. *VM/SAC* 67:1249, 1972.
 52. Muralidhara, K.S. et al. Colonization of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in Intestines of Pigs. *J. Dairy Sci.* 56(5):635, 1973.
 53. Fuller, R.; Brooker, B.E. *Lactobacilli* Which Attach to the Crop Epithelium of the Fowl. *Amer. J. Clin. Nutr.* 67:1305-1312, 1974.
 54. Schaedler, R.W.; Dubos, R.J. The Faecal Flora of Various Strains of Mice. Its Bearing on Their Susceptibility to Endotoxin. *J. Exp. Med.* 115:1149-1160, 1962.
 55. Hill, I.R. et al. The Effect of Dietary *Lactobacilli* on In-vitro Catabolic Activities of the Small Intestinal Microflora of Newly Weaned Pigs. *J. Med. Micro.* 3:593-605, 1970.
 56. Vakil, J.R.; Shahani, K.M. Partial Purification of Antibacterial Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Bacteriol. Proc.* 9:9, 1965.
 57. Hamdan, I.Y.; Mikolajcik, E.M. Growth, Viability, and Antimicrobial Activity of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 56:638, 1973.
 58. Kodama, R. Studies on Lactic Acid Bacteria. II. Lactoin, A New Antibiotic Substance Produced by Lactic Acid Bacteria. *J. Antibiot.* 5:72, 1952.
 59. Mattick, A.T.R.; Hirsch, A. A Powerful Inhibitory Substance Produced by Group N Streptococci. *Nature* 154:551, 1944.
 60. Oxtford, A.E. Diplococcin and Antibacterial Protein Elaborated by Certain Milk Streptococci. *Biochem. J.* 38:178, 1944.
 61. Dahiya, R.S.; Speck, M.L. Hydrogen Peroxide Formation by *Lactobacilli* and its Effect on *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.* 51:1568, 1986.
 62. Price, R.J.; Lee, J.S. Inhibition of *Pseudomonas* Species by Hydrogen Peroxide Producing *Lactobacilli*. *J. Milk Food Tech.* 33:13, 1970.
 63. Mikolajcik, E.M.; Hamdan, I.Y. *Lactobacillus acidophilus*. II. Antimicrobial Agents. *Cultured Dairy Products J.* 10:18, 1975.
 64. Goeplert, J.M.; Hicks, R. Effect of Volatile Fatty Acids on *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 97:956-958, 1969.
 65. Barrow, P.A. et al. Changes in the Microflora and Physiology of the Anterior Intestinal Tract of Pigs Weaned at Two Days, with Special Reference to the Pathogenesis of Diarrhea. *Infect. and Immun.* 18:586-595, 1977.
 66. Backstrom, L.; Morkoc, A. *Streptococcus faecium* in Prevention of Neonatal Colibacillosis in Piglets. Research report: Dept. of Veterinary Clinical Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, 1983.
 67. Mickelson, M.J.; Klipstein, F.A. Enterotoxigenic Intestinal Bacterial Tropical Spruce. IV. Effect of Linoleic Acid on Growth Interrelationships of *Lactobacillus acidophilus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. and Immun.* 12:1121-1153, 1975.
 68. Barrow, B.A. et al. The Attachment of Bacteria to Gastric Epithelium of the Pig and Its Importance in the Microecology of the Intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 48:147, 1980.
 69. Fuller, R. Bacteria That Stick to the Gut. *New Scientist* 30:506-507, 1972.
 70. Chopro, S.L. et al. Intestinal Microflora Associated with Enteritis of Early Weaned Pigs. *Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 37:292, 1963.
 71. Abrams, G.D.; Bishop, J.E. Normal Flora and Leukocyte Mobilization. *Arch. Pathol.* 79:213-217, 1965.
 72. Friend, A. et al. Effect of Feeding and Intraperitoneal Implantation of Yogurt Culture Cells on Ehrlich Ascites Tumor. *Milchwissenschaft* 37:708, 1982.
 73. Kato, I. et al. Antitumor Activity of *Lactobacillus casei* in Mice. *Gann* 72:517, 1981.
 74. Matsuzaki, T. et al. Antitumor Activity of *Lactobacillus casei* on Lewis Lung Carcinoma and Line-10 Hepatoma in Syngeneic Mice and Guinea Pigs. *Cancer Immunol. Immunother.* 20:18, 1985.
 75. Yasutake, N. et al. Host-mediated Antitumor Activity of *Lactobacillus casei* in Mice. *Gann* 75:72, 1984.
 76. Ishii, J. et al. Inhibition of Tumor Growth in Vivo and in Vitro by Macrophages from Rats Treated with a Streptococcal Preparation OK 432. *Gann* 67:115, 1976.
 77. De Simone, C. et al. The Adjuvant Effect of Yogurt on Production of Gamma-interferon by ConA-Stimulated Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Nutr. Rep. Intl.* 33:419-433, 1986.
 78. Epstein, L.B. The Special Significance of Interferon-Gamma. *Interferons and Immune System* (J. Vileck; E. DeMaeyer, eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1984; p 185.
 79. Perdigon, G. et al. Enhancement of Immune Response in Mice Fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 70:919-926, 1987.

Immune stimulation

Untersuchungen stellte er jedoch schon fest, daß es sich nicht nur um eine Art, sondern um mehrere ähnliche, saure Nährböden bevorzugende Arten handeln müsse. In einer späteren Arbeit wies er darauf hin, daß „*Bacillus acidophilus*“ besser auf schwach alkalischen als auf sauren Nährböden gedeiht und daß die saure Bierwürzbouillon nur für die elektive Kultivierung aus dem Darminhalt erforderlich ist.

Inzwischen wurden von CIRPOLINA (1902) und WEISS (1904) beim Erwachsenen ebenfalls „acidophile“ Stäbchen isoliert. WEISS stellte dabei fest, daß es sich um eine Reihe von Arten handelte und daß auch gasbildende darunter waren. Ebenso isolierte ORLA-JENSEN (1919) aus menschlichen Faeces Laktobazillen der Subgenus *Strepto-* und *Betabacterium*. In darauf folgenden Arbeiten versuchten verschiedene Autoren, den eigentlichen *Lactobacillus acidophilus* genau zu charakterisieren. (KULP und RETTGER, 1924; KOPELOFF, 1926; DRUCKREY, 1928; ORLA-JENSEN und Mitarb., 1935/36; ORLA-JENSEN, 1943). ORLA-JENSEN und Mitarb. (1935/36) wählten dabei für den bisher als *Lactobacillus acidophilus* beschriebenen Keim die Bezeichnung *Thermobacterium intestinale*, weil auch andere Laktobazillenarten säuretolerant waren. Dieser Name wurde jedoch nicht in die übrige Literatur übernommen, sondern es blieb bei der Bezeichnung *Lactobacillus acidophilus* für den aerob wachsenden obligaten Darmkeim.

Immer wieder gab es jedoch Schwierigkeiten bei der Eliminierung des *Lactobacillus acidophilus*, so daß in der neueren Literatur weitere Arbeiten über eine genaue Charakterisierung und leichtere Abgrenzung des *L. acidophilus* von anderen Laktobacillen mit Hilfe anderer Nährböden und Methoden erschienen (ROCOSA und Mitarb., 1953; BRIGGS, 1953a,b; WHEATER, 1955; SHARPE und MATTICK, 1957; KUNDRAT, 1958). Über biologische Besonderheiten des *L. acidophilus* wurden in neuerer Zeit einige Arbeiten veröffentlicht (MEHNERT, 1960; BAUMGÄRTEL, 1960, 1961).

Untersuchungen über die Herkunft aerober Laktobazillen und ihre Ansiedlungsfähigkeit im menschlichen Darm

Experimentelle Untersuchungsergebnisse darüber liegen vor von CHEPLIN und RETTGER (1920a,b; 1921), RETTGER und CHEPLIN (1921), KOPELOFF (1926), DRUCKREY (1928), MAURER (1929), HENNEBERG, W. (1934/35), HENNEBERG, G. (1940), ORLA-JENSEN und Mitarb. (1945), CARRAZ und MOULIN (1958b), CARRAZ und Mitarb. (1960a).

Untersuchungen höherer Darmabschnitte

Um Aufschluß über die Zusammensetzung der Flora in höheren Darmabschnitten zu bekommen, beschritt man verschiedene Wege. Grundlegende Arbeiten mit Sonden und Kapseln unternahm VAN DER REIS (1922, 1925) BOGENDÖRFER (1922, 1924) und BOGENDÖRFER und BUCHHOLZ (1923), wobei sie feststellten, daß der Dünndarm relativ keimarm und auch arm an Arten war. Neuere Untersuchungen mit Sonden und Kapseln führten MARTINI und Mitarb. (1957) und HENNING und Mitarb. (1959) durch. Punktionen des Dünndarmes bei gynäkologischen- und Magenoperationen führten CREGAN und Mitarb. (1953a,b) aus.

Untersuchungen an Leichen waren sehr früh schon vorgenommen worden. VAN DER REIS verglich 1925 seine mit Sonde und Kapsel erhaltenen Befunde mit den Literaturangaben über Untersuchungen an Leichen und konnte eine Übereinstimmung mit seinen Dünndarmbefunden feststellen. Erst in neuerer Zeit wurden von HAENEL und MÜLLER-BEUTHOW (1958) umfangreiche Untersuchungen an Leichen vorgenommen.

Eigene Versuche

Untersuchungsmaterial und -methodik

Als Untersuchungsmaterial zum Nachweis aerober Laktobazillen im Darm Erwachsener dienten zunächst Faecesproben von 21 im Institut tätigen Personen im Alter von 20–55 Jahren, die ihre normale Nahrung zu sich nahmen. Diese Proben wurden zunächst bei allen Versuchspersonen stichprobenweise und bei einzelnen schließlich über kürzere Zeiträume regelmäßig untersucht.

Aus dem Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin
(Damaliger Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. M. LERCHE)

Das Vorkommen aerob wachsender grampositiver Stäbchen des Genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt erwachsener Menschen

(Gleichzeitig ein Beitrag zur genaueren Kenntnis der aeroben Laktobazillen)¹⁾

M. Lerche und G. Reuter

Mit 6 Abbildungen im Text

Eingegangen am 25. November 1961

Seitdem es MORO (1900a, b) gelang, aus dem Darminhalt von Säuglingen grampositive, aerob wachsende, nicht sporenbildende Stäbchen zu isolieren, wurden viele Versuche unternommen, diese Keime näher zu bestimmen, die Häufigkeit und Regelmäßigkeit ihres Vorkommens im Säuglings- und Erwachsenenendarm zu ermitteln und die Kausalität ihres Vorhandenseins im menschlichen Darminhalt zu ergründen. Dabei stellte sich heraus, daß die isolierbaren grampositiven Stäbchen nicht als eine Art anzusprechen sind, sondern eine Gruppe verschiedener Species darstellen. Es kam durch mancherlei Veröffentlichungen zu Unklarheiten und Widersprüchen, weil man sich nicht immer um eine eingehende Differenzierung der isolierten Stäbchen bemühte. Deshalb soll mit dieser Arbeit versucht werden, die im Darminhalt anzutreffende „*Acidophilus*-Gruppe“ zu analysieren und über die quantitativen Relationen der einzelnen Arten Aufschluß zu erhalten.

Literatur

Isolierung der aerob wachsenden Laktobazillen aus dem menschlichen Darminhalt und Abgrenzung des *Lactobacillus acidophilus*.

MORO (1900a) beschrieb eingehend die von ihm aus dem Säuglingsdarm isolierten grampositiven, aerob wachsenden, nicht sporenbildenden Stäbchen und nannte sie wegen ihrer Kultivierbarkeit in saurer Bierwürzbouillon „*Bacillus acidophilus*“. Im Laufe seiner

¹⁾ Die Arbeiten wurden mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Später wurden gezielte Nachweisversuche vorgenommen, die Aussagen über die Isolierbarkeit aerober Laktobazillen aus dem Stuhl nach oraler Einnahme von bestimmter laktobazillenhaltiger Nahrung und von Reinkulturen dieser Keime durch die Versuchspersonen ermöglichen sollten. Zu diesem Zwecke wurde anderweitige laktobazillenhaltige Nahrung vermieden.

Zum Nachweis der Laktobazillen im Inhalt höherer Darmabschnitte wurden Probenentnahmen an Leichen durchgeführt¹⁾. Die Proben von 30 Leichen wurden aus abgebundenen Darmschlingen des beginnenden Jejunum, des beginnenden und des endenden Ileum, des Caecum und des Colon descendens durchschnittlich 1-2 Tage nach dem Exitus entnommen und innerhalb von 2 Std. bakteriologisch angelegt.

Als Methodik der Stuhlprobenaufschwemmung benutzten wir die gleiche wie bei der Untersuchung auf anaerobe Laktobazillen (LERCHE und REUTER, 1961).

Zwecks Isolierung der Laktobazillen wurden jeweils 0,1 ml der Verdünnungsstufen 10⁻³ und 10⁻⁴ auf Briggs-Agar mit 0,04 % Sorbinsäure, dessen Herstellung in einer vorhergehenden Arbeit beschrieben wurde (LERCHE und REUTER, 1960) ausgespatelt. Diese Platten wurden aerob bei 37°C 2 Tage und bei 30°C 1 Tag bebrütet.

Der Nährboden hemmt allgemein die gramnegativen Keime, die Hefen und die Schimmelpilze, die Mikrokokken und einen großen Teil der Streptokokken. Leider kamen die Enterokokken mit zur Entwicklung, jedoch nur als sehr kleine Kolonien, die leicht abzugrenzen waren, ebenso Aerogenes-Keime, die sich jedoch auch durch eine ganz anders geartete Koloniform auszeichneten. Der Nährboden läßt dagegen Laktobazillenarten bis auf einzelne Ausnahmen gut zur Entwicklung kommen. *L. bulgaricus* wächst nicht darauf an, und bei *L. acidophilus* ist die Anwachsrate etwas verringert. Im Verlauf von Versuchen zur Verbesserung der Kultivierung des *L. acidophilus* stellte sich jedoch heraus, daß eine größere Anwachsrate zu erreichen war, wenn die Platten in einem Leuchtgasmilieu bebrütet wurden. Dies wurde erreicht, indem die Platten in Exsikatoren verbracht und die Gefäße nach einmaligem Evakuieren bis auf 20 Torr mit Leuchtgas gefüllt wurden. Zu den folgenden Untersuchungen wurden deshalb sowohl aerob als auch anaerob zu bebrütende Briggs-Sorbinsäure-Platten beimpft.

Die nach der entsprechenden Inkubationszeit herangewachsenen Laktobazillenkolonien wurden nach Form und Größe getrennt, als Reinkulturen gezüchtet und mittels biochemischer und physiologischer Tests (siehe LERCHE und REUTER, 1960) differenziert.

Um auch einen Überblick über die übrige aerobe Darmflora zu bekommen, wurden gleiche Verdünnungsstufen auf Normal- und Drigalski-Agar zur Kultivierung der gramnegativen und Kokkenflora und auf Würze-Agar zur Isolierung von Hefen angelegt. Bei den Untersuchungen von Leichenproben wurden gleichzeitig Blutplatten nach Hackenthal-Bierkowski zum Nachweis der *L. bifidus*-Gruppe nach der beschriebenen Methodik (REUTER, 1961) angelegt. Hierbei wurden jedoch höhere Verdünnungsstufen ausgespatelt.

Untersuchungsergebnisse

Stuhluntersuchungen bei normaler Ernährung

Da es zunächst galt, das Vorhandensein von aerob wachsenden Laktobazillen im Stuhl Erwachsener nachzuweisen, wurden anfangs stichprobenweise 50 Stuhlproben von 21 im Institut tätigen Personen verschiedenen Alters und Geschlechtes, die sich wie gewohnt ernährten und bei denen keine Verdauungsstörungen vorlagen, untersucht. Es konnten 43 Stämme verschiedener Species des Genus *Lactobacillus* isoliert und die Arten *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. leichmannii*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermenti* identifiziert werden. Sie traten bei den untersuchten Proben einzeln oder in verschiedenen Kombinationen zusammen auf. Mehr als 3 Arten gleichzeitig wurden nicht angetroffen. Ihr Vorkommen ließ keine Regel- oder Gesetzmäßigkeit erkennen.

¹⁾ Herr Prof. Dr. MASSHOFF vom Patholog. Institut der Freien Universität ermöglichte uns dankenswerterweise die Beschaffung des Untersuchungsmaterials.

Bei einer Person wurden daraufhin 7 Proben an aufeinanderfolgenden Tagen untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls, daß die Laktobazillenflora nicht konstant war, aber innerhalb von 2-3 Tagen ähnlich in ihrer Zusammensetzung blieb.

Die Laktobazillenflora in den Faeces setzte sich also aus mehreren Arten zusammen und enthielt entgegen aller Erwartung nur selten den eigentlichen *Lactobacillus acidophilus*. Es ergab sich weiterhin, daß neben den schon genannten Species eine neue Laktobazillenart im Darminhalt anzutreffen ist. Diese ließ sich später, nachdem mehrere solcher Stämme isoliert und überprüft worden waren, in ihren physiologischen und biochemischen Eigenschaften mit denen von ROGOSA (1953) in der Mundflora als *L. salivarius* nov. spec. beschreiben. Diese von uns isolierten Stämme wurden fortan als *L. salivarius* geführt. Eine Zusammenstellung und Aufschlüsselung der aus den 57 Stuhlproben isolierten Laktobazillen ist in Tabelle 1 vorgenommen worden. Wie daraus zu ersehen ist, wurde am häufigsten *L. fermenti* gefunden. Die Arten *L. casei*, *L. plantarum* und *L. brevis* wurden etwa gleich oft wie *L. acidophilus* angetroffen; 22 der Stuhlproben waren laktobazillenfrei, 17 enthielten nur einen Stamm, 12 zwei und 6 sogar drei Stämme.

Tabelle 1
Isolierte Laktobazillen aus 57 Stuhlproben von 21 Personen bei normaler Ernährung derselben

Subgenus nach ORLA-JENSEN	Species	Zahl der isolierten Stämme
Thermobakterium (kein Wachstum bei 15°C)	<i>L. lactis</i>	5
	<i>L. acidophilus</i>	8
	<i>L. salivarius</i>	2
Streptobakterium (Wachstum bei 15°C)	<i>L. casei</i>	9
	<i>L. plantarum</i>	10
	<i>L. leichmannii</i>	1
Betabakterium (Gas aus Glukose)	<i>L. brevis</i>	9
	<i>L. buchneri</i>	3
	<i>L. fermenti</i>	12
	9 Arten	59

Es ergab sich daher die Fragestellung, warum ein Teil der Stuhlproben keine Laktobazillen aufwies, der andere Teil jedoch eine oder mehrere Arten beherbergte. Eine Befragung der Versuchspersonen nach ihrer die letzten Tage zuvor eingenommenen Nahrung ließ die Vermutung zu, daß ein Zusammenhang zwischen zugeführter laktobazillenhaltiger Nahrung und in den Faeces ausgeschiedenen Laktobazillen bestehen könnte.

Stuhluntersuchungen bei gezielten Nachweisversuchen

Um über die Reisolierbarkeit oral zugeführter Laktobazillen Aufschluß zu erhalten, wurden mit 8 Personen (A–H benannt), die sich dankenswerterweise dazu bereit erklärten, Versuche durchgeführt. Zunächst wurde der Einfluß eines bekannt laktobazillenhaltigen Nahrungsmittels auf die Darmflora untersucht. Dieses durfte nur wenige Arten beherbergen. Geeignet erschienen die natur-milchsauren Produkte Sauerkraut und saure Gurke, in denen sich *L. brevis* und *L. plantarum* nachweisen lassen. Von den Versuchspersonen wurden einige Tage lang täglich etwa 0,25–0,5 kg Sauerkraut und 1 ganze Gurke genossen. Die Einnahme größerer Mengen erwies sich wegen des hohen Salzgehaltes als schwierig. Da die mit der Nahrung zugeführten Stämme nicht kenntlich zu machen waren, wurden die Versuchspersonen gehalten, alle anderen laktobazillenhaltigen Nahrungsmittel einige Tage vor und während des Versuches zu vermeiden. Der Stuhl wurde vor und während des Versuches, nach Möglichkeit täglich, auf das Auftreten von Laktobazillen untersucht. Bei einigen Versuchspersonen (D, E, G) konnte es erreicht werden, daß in den Stuhlproben vor Beginn des Versuches bei Einhaltung der Nahrungsbeschränkung in den für die Untersuchungen verwandten Verdünnungsstufen keine Laktobazillen mehr nachzuweisen waren. Die Versuchspersonen D und E wiesen allerdings auch vorher bei normalen Untersuchungen keine oder selten Laktobazillen im Stuhl auf. Bei den anderen Versuchspersonen jedoch traten immer wieder, qualitativ und quantitativ unterschiedlich, Laktobazillen auf. Diese Keime mußten entweder noch im Darm enthalten gewesen, oder aus anderen Quellen zugeführt worden sein. Trotzdem gelang es, die mit dem Sauerkraut und den sauren Gurken zugeführten Keime, wenn auch nicht oft und nur in geringer Menge, im Stuhl nachzuweisen.

Um den Beweis der Reisolierbarkeit zu führen, gingen wir dazu über, größere Mengen einer bestimmten Laktobazillenart einmalig zu verabfolgen. Es wurden auszentrifugierte Reinkulturen in verdünntem Tomatensaft aufgeschwemmt und von den Versuchspersonen morgens nüchtern eingenommen. Die anschließenden Stuhluntersuchungen ergaben eindeutig ein zahlreiches Auftreten der eingegebenen Keime nach 1–2 Tagen. An den darauffolgenden Tagen wurde die Zahl der kulturell nachweisbaren Keime immer geringer, bis diese schließlich gänzlich verschwanden. Mit Hilfe der morphologischen, der physiologischen und der biochemischen Kriterien konnten die aus den Faeces isolierten Stämme als die eingegebenen identifiziert werden.

Der eindeutige Beweis, daß es sich bei den aus der Stuhlprobe kultivierten Keimen um die eingegebene Species handelte, konnte bei Einnahme von 2 koloniemorphologisch verschiedenen *L. brevis*-Stämmen erbracht werden. Von beiden Stämmen wurde etwa die gleiche Menge eingenommen. Sowohl auf der Kontroll- als auch auf der Stuhlprobenplatte traten in etwa gleicher Verteilung die beiden Stämme mit ihren spezifischen Kolonieförmigkeiten auf. Es handelte sich dabei nicht um die Dissoziation eines Stammes, sondern um 2 typspezifische Wuchsformen.

Wurden bei weiteren Versuchen 2 Kulturen verschiedener Species gleichzeitig eingenommen, so konnte es dazu kommen, daß im Stuhl 1 Stamm zahlenmäßig weit geringer nachweisbar war als der andere. Ein unterschiedliches Wachstum zeigt sich aber auch bei gemeinsamer Kultivierung verschiedener Laktobazillenstämme in flüssigen Kulturmedien.

Die Untersuchungsbefunde sind in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt worden. Letztere soll nur der Gegenüberstellung der Anzahl der Reisolierungen und der gleichzeitigen Neuisolierungen im Laufe der Versuche dienen und zeigen, daß trotz Weglassung laktobazillenhaltiger Nahrungsmittel zahlreiche andere als die eingegebenen Stämme in den Stuhlproben anzutreffen waren und sich *L. acidophilus* und *L. salivarius* während der Versuche im Gegensatz zu den Befunden bei normaler Ernährung in größerer Zahl nachweisen ließen. Letztere Art kam in der Hälfte der laktobazillenhaltigen Proben vor.

Tabelle 2

Das Vorkommen von Laktobazillen in 149 von 176 untersuchten Stuhlproben von 8 Personen bei gezielten Nachweisversuchen.

Arten	Bei einzelnen Versuchspersonen								Häufigkeit der Arten
	A	B	C	D	E	F	G	H	
Neu isolierte Stämme									
<i>lactis acid. saliv.</i>	8	4	17	3	4	1		1	38
<i>casei plant. leichm.</i>	18	17	15		7	6		9	72
<i>brevis buch.</i>	6	12			1				19
<i>ferm.</i>	4		6	5					15
									—
<i>brevis buch.</i>	1	2	1					1	5
<i>ferm.</i>	3	1		1					5
	12	12	1	3					28
Isolierungen pro Person	52	48	40	12	12	7	—	11	—
Probenanzahl pro Person	32	34	28	25	25	6	12	14	—
Re-isolierte Stämme									
<i>lactis acid. saliv.</i>	3		1		1	1			3
<i>casei plant. leichm.</i>	2	1	1		3	1	3	4	10
<i>brevis buch.</i>	7	12	4	8	5	2		3	38
<i>ferm.</i>	2	3	5				1		8
									11

Die Tabelle 2 kann jedoch nichts Objektives über die Reisolierbarkeit der einzelnen Species aussagen, weil diese nicht alle gleich oft eingegeben wurden. Vielmehr ist das Maß der Reisolierbarkeit der einzelnen Species aus folgendem Text und zum Teil aus Tabelle 3 zu entnehmen, in der aus Platzmangel nur einige Beispiele angeführt werden konnten.

L. brevis wurde als Reinkultur an 5 Personen erprobt und ließ sich bei Person A, C und E gut und vier Tage lang, bei D ebenfalls gut und sogar 7 Tage lang, bei B hingegen mäßig gut und nur zwei Tage lang nachweisen.

L. buchneri, der allerdings nur mit jeweils einem anderen Stamm kombiniert verabreicht worden war, ließ sich bei allen 3 Personen (A, B, H) gut und über 3 Tage hinweg nachweisen.

Tabelle 3

Bei gezielten Nachweisversuchen bei einzelnen Personen neu- und reisolierte aerobe Laktobazillen (Aus Platzmangel können leider nur einige Beispiele angeführt werden)

Datum	Vor- kommen von Lakto- bazillen	Nachgewiesene Laktobazillenarten				
		acid.	saliv.	casei	brevis	buchn. ferm.
Versuchsperson C, 30 Jahre, männlich (Einmalige Einnahme von <i>L. brevis</i> am 23. Mai 1960)						
19. 5.	+	(+)	4			
19. 5.	+	15	15			
23. 5.	+	+	10			
24. 5.	+					
25. 5.	+	++				[+++++]
25. 5.	+	10				[+++++]
27. 5.	+	+				[+++]
30. 5.	+	10				[10]
Versuchsperson E, 35 Jahre, weiblich (Einmalige Einnahme von <i>L. casei</i> und <i>L. acidophilus</i> am 20. Juni 1960)						
16. 6.	+	12				
20. 6.	+	6				
21. 6.	-					
22. 6.	+					
23. 6.	+	[+]	17			[+++++]
24. 6.	+		+			[+++++]
27. 6.	+		(+)			
Versuchsperson B, 31 Jahre, männlich (Einmalige Einnahme von <i>L. fermenti</i> am 20. Juni 1960)						
16. 6.	+	5	10			15
20. 6.	+		15			
21. 6.	+	30	+			[+]
22. 6.	+		(+)			[+++++]
23. 6.	+		15			[+++++]
24. 6.	+	5	6			[+]
27. 6.	+		+			[(+)]
(Einmalige Einnahme von <i>L. buchneri</i> und <i>L. leichmannii</i> am 18. Juli 1960)						
18. 7.	+		(+)			
19. 7.	+		+			[++]
20. 7.	+		+			[+++]
21. 7.	+		+			[25]
22. 7.	+		25			

Mengenangaben: (Verdünnung 10⁻⁴) Sonstige Angaben:
 1-50 = genaue Anzahl der Keime Datum in halbfetten Ziffern = Kontrollunter-
 (+) = ab 50-100 Keime suchung
 + = ab 100-200 Keime Mengenangaben in [] = Reisolierungen
 ++ = ab 200-500 Keime
 +++ = ab 500-1000 Keime
 ++++ = ab 1000 Keime

L. fermenti ließ sich, als Einzelkultur verabfolgt, bei Person B gut und 6 Tage hindurch, kombiniert mit einem anderen Stamm, bei Person C mäßig gut und 3 Tage hindurch und bei Person G nur an 1 Tage schwach nachweisen.

L. casei ließ sich sowohl als Einzelkultur bei Person H, als auch als kombinierte Kultur bei Person E gut und über 4 Tage hinweg nachweisen. Bei der Einnahme eines pharmazeutischen Präparates, das laut Deklaration einen antibiotikaresistenten Stamm von *L. acidophilus* enthalten sollte, der sich jedoch bei wiederholter Prüfung als *L. casei* erwies, konnte dieser *L. casei*-Stamm bei einmaliger Einnahme von 6 Milliarden Keimen auch reisoliert werden, bei Person A jedoch nur in geringer Zahl während 2 Tagen und bei Person C in stärkerem Maße, aber nur an 1 Tag.

L. plantarum wurde nur einmal kombiniert gegeben und ließ sich bei Person G gut und über 3 Tage hinweg nachweisen.

L. leichmannii konnte bei 4 Personen (A, B, C, H) überhaupt nicht wieder ermittelt werden. Die Species war allerdings nur kombiniert gegeben worden.

L. acidophilus und *L. salivarius* nahmen ebenfalls eine Sonderstellung ein. Sie konnten entweder überhaupt nicht oder nur schwach und auch nur kurze Zeit hindurch wieder kultiviert werden. *L. acidophilus* wurde bei Person C und G als Einzelkultur verabreicht und konnte bei letzterer nur an einem Tag in geringer Zahl nachgewiesen werden, bei ersterer ebenso, jedoch nicht einwandfrei als eingenommener Stamm, weil während des Versuches normalerweise geringe Mengen von *L. acidophilus* auftraten. Bei gemischter Verabreichung konnten bei Person D keine entsprechenden Keime und bei Person E wenige und diese nur an einem Tage ermittelt werden.

L. salivarius war, kombiniert verabreicht, bei Person D nicht, als Einzelkultur verabreicht, bei Person A nur in geringem Maße über 3 Tage hinweg nachweisbar.

Die Untersuchung des Inhaltes höherer Darmabschnitte

Die mangelnde Reisolierbarkeit eingegebener *L. acidophilus*- und *L. salivarius*-Stämme stellte ein neues zu lösendes Problem dar, insbesondere deshalb, weil beide Arten bei Stuhluntersuchungen, und zwar besonders bei den Versuchen, als nicht verabreichte Keime isoliert werden konnten. Es war dabei beobachtet worden, daß *L. acidophilus* in der Regel dann häufiger im Stuhl anzutreffen war, wenn eine beschleunigte Peristaltik vorgelegen hatte und der Stuhl feuchter als üblich war. Beides wurde durch unsere Versuche provoziert, denn Milchsäure stellt bekanntlich ein peristaltikförderndes Agens dar. Diese Beobachtung legte den Gedanken nahe, daß die genannten Keime ihre optimalen Lebensbedingungen in höheren Darmabschnitten hätten und auf der langsamen Passage durch das Colon absterben würden. Aus diesem Grunde gingen wir zur Untersuchung höherer Darmabschnitte über.

Als einfachster Weg zur Orientierung über dieses Problem erschien die Untersuchung von Leichenmaterial, wobei allerdings Abweichungen vom Physiologischen durch die meist zuvor abgelaufene Krankheit und den Alterungsprozeß nach dem Tode von vornherein beachtet werden mußten. Es wurde zunächst die Darmflora von Leichen ohne Rücksicht auf Lebensalter und Todesursache auf Laktobazillen untersucht. Dabei wurde gleichzeitig die übrige Flora kontrolliert.

Schon nach den ersten Untersuchungen stellte sich heraus, daß bei septischen und urämischen Erkrankungen und ebenso bei hohem Lebensalter keine Laktobazillen isoliert werden konnten, der gesamte Darmkanal jedoch von Enterokokken und gramnegativen Keimen in großer Zahl besiedelt war. Dabei war bemerkenswert, daß an Stelle von *Coli*-Keimen teilweise oder ganz Aerogenes- und vereinzelt laktosenegative „*Paracoli*“-Keime auftraten. Außerdem waren des öfteren *Proteus* und gelegentlich *Bact. Pyo-*

cyaneum festzustellen. Eine Zusammenstellung und Aufgliederung dieser untersuchten Fälle ist in Tabelle 4 vorgenommen worden.

Tabelle 4

Zusammenstellung der untersuchten Leichen mit fehlender aerober Laktobazillenflora

Aufteilung nach Gruppen	Fall Nr.	Alter	Klin. Diagnose	Nachweisbare aerobe Darmkeime					
				Enterok.	Coli	Aerog.	Parac.	Proteus	Pyocyan.
Erhöhte Tempera- turen	I	33	Peritonitis	+	+	+			
	VI	32	Encephalitis	+	+	+		+	
	XVIII	31	Peritonitis	+	+				+
	XXVI	34	Encephalitis (Leucopenie)	+	+	+			
Uraemie	II	67	Nephrosklerose	+	+				
	IV	54	Hydronephrose	+	+			+	
	VIII	77	Pyelonephritis	+	+			+	
	X	83	Pyelonephritis	+	+				+
Hohes Lebensalter	IX	85	dekomp. Hypertonus	+	+		+		
	XI	77	Akutes Herzversagen	+	+	+			
	XIII	78	Herz-Kreislaufversagen nach Magenperforation	+	+	+	+		
	XIV	67	Apoplekt. Insult mit Hemiparese	+	+	+			+
Sonstige	XXI	35	Mitralstenose III	+	+				
	XXVIII	52	Herzversagen (Untersuchungsmaterial 1 Woche tiefgefroren)	+	+				

Nachdem diese Tatsache bekannt war, wurde der Darminhalt von Personen, die an septischen und urämischen Krankheitsprozessen gestorben waren, nicht mehr untersucht, und wir wählten Fälle aus mit nicht zu hohem Lebensalter. Dabei wurden bei 16 von insgesamt 30 untersuchten Fällen aerob wachsende Laktobazillen isoliert. Verschiedene Species wurden identifiziert: *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. fermenti*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*. Diese Arten kamen bei den einzelnen Fällen in verschiedenen Zusammenstellungen ohne bestimmte Gesetzmäßigkeit vor. Einmal wurden alle 6 Arten gleichzeitig, zweimal wurden 5, dreimal wurden 4 und zweimal wurden 3 Arten nachgewiesen. Je viermal waren eine Art bzw. zwei Arten zu isolieren.

Die genaue Aufschlüsselung ist aus Tabelle 5 zu ersehen. Aus dieser Tabelle geht auch hervor, wie oft die einzelnen Species auftraten. So waren *L. acidophilus* und *L. fermenti* am häufigsten anzutreffen, *L. salivarius*, *L. casei* und *L. plantarum* kamen weniger häufig vor, *L. brevis* dagegen trat nur vereinzelt auf. Alle Species waren sowohl aus dem Dünndarm als auch aus dem Dickdarm zu isolieren. Die 3 untersuchten Abschnitte des Dünndarms wiesen jedoch im Hinblick auf die vorgefundenen Laktobazillenarten teilweise erhebliche Unterschiede auf. Oft waren im begin-

nenden Jejunum die meisten Arten anzutreffen. Die Keimflora der zwei untersuchten Dickdarmabschnitte war in qualitativer Hinsicht gleich oder ähnlich. Meist war auch die Keimflora zwischen unterem Ileum und Caecum sehr ähnlich.

Über das quantitative Vorkommen der aeroben Laktobazillenarten konnten gleichzeitig wichtige Feststellungen getroffen werden. Wiederum wies die Flora des Dünndarms größere Unterschiede auf. War in den oberen und mittleren Abschnitten nur Darmschleim enthalten, so lagen meist wenig oder keine Laktobazillen vor, enthielt das Darmlumen jedoch Chymus, so waren sie zahlreich vorhanden. Besonders im oberen Jejunum traten bei derartigen Fällen die Laktobazillen in großer Menge auf. Das untere Ileum enthielt fast immer Laktobazillen. Von den beiden untersuchten Dickdarmabschnitten beherbergte das Caecum die größten Mengen an Laktobazillen. In Tabelle 5 ist für die einzelnen Arten, aufgeführt nach ihrer Lokalisation im Dünndarm und Dickdarm, angegeben worden, in welchem Darmabschnitt sie am zahlreichsten angetroffen wurden.

Bei den Untersuchungen höherer Darmabschnitte wurde immer der pH-Wert mit Hilfe von Indikatorpapier (Merck, Spezial-Indikator-Papier) ermittelt, bis auf die wenigen Fälle, bei denen im unteren Ileum keine Ingestamassen und auch kein Darmschleim vorhanden waren. Die ermittelten pH-Werte wurden in Tabelle 6 für die Fälle, bei denen keine aeroben Laktobazillen gefunden wurden und in Tabelle 7 für die Fälle mit nachgewiesenen Laktobazillen zusammengestellt. Es sind darin die Grenzwerte und die arithmetischen Mittelwerte für jeden Darmabschnitt enthalten. Bei der Auswertung wurden jedoch bei Tabelle 6 die urämischen und die septischen Fälle außer acht gelassen, da bei ihnen durch die Überwucherung des gesamten Dünndarms mit gramnegativen Stäbchen und Enterokokken erhebliche Abweichungen von den physiologischen Werten eingetreten waren. Wenn als Todesursache Herz- und Kreislaufversagen angegeben war, zeigten die pH-Reaktionen in den Dünndarmabschnitten bei den einzelnen Fällen ziemlich übereinstimmende Werte.

Bei Tabelle 7 wurden 3 Fälle (Kachexie) und ein Fall (6 Tage nach dem Tode) aus dem gleichen Grunde nicht ausgewertet. Bei den übrigen zeigten die einzelnen Dünndarmabschnitte wiederum ziemlich gleiche Reaktionen, wobei die Übereinstimmung im oberen Jejunum größer war und nach dem unteren Ileum hin abnahm.

Die in Tabelle 7 angeführten Grenz- und Durchschnittswerte liegen gegenüber denen der Tabelle 6 durchweg um einige Stufen niedriger.

Es kann also festgestellt werden, daß die pH-Werte im oberen Jejunum ziemlich konstant sind und um 6,2 herum liegen, im oberen Ileum allgemein etwas ansteigen und durchschnittlich 6,4 betragen, im unteren Ileum entweder wieder etwas abfallen, vorwiegend bei den Laktobazillenhaltigen Fällen, oder aber weiter ansteigen und sich den im Caecum herrschenden Reaktionen allmählich nähern. Im Dickdarm ist bis auf wenige Fälle ein weiteres Ansteigen des pH-Wertes festzustellen, bei Laktobazillenhaltigem Darminhalt jedoch in weit geringerem Maße als beim Laktobazillenfreien.

Beitrag zur genaueren Kenntnis der Laktobazillen

Bei der Differenzierung der aus den Stuhl- und Darminhaltsproben isolierten Laktobazillen zeigten sich bei einigen Arten morphologische, physiolo-

gische und biochemische Abweichungen von den in einer vorhergehenden methodischen Arbeit (LERCHE und REUTER, 1960) angegebenen Kriterien. Die dort angegebenen Kennzeichen resultierten aus Untersuchungsbefunden vor-

Tabelle 5. Isolierte aerobe Laktobazillen aus dem menschlichen Darm (angegeben ist sowohl vom betreffenden Keimart pro g Inhalt) (Verdünnungsfaktor: 10⁴)

Fall Nr.	Alter und Geschl.	Gew. (kg)	Ent-nahme Er-nahme nach Exitus in Std.	Ingesta Dinn-darm	L. acid. Dinn-darm	L. acid. Dick-darm	L. saliv. Dinn-darm	L. saliv. Dick-darm
III	66, m.	—	±	[+]	[+]	[+]	[+]	[+]
V	63, m.	34 kach.	—	+	I 2	+	(+)	+
VII	40, m.	76	+	+	I	(+)	+	+
XII	51, w.	35 kach.	—	+	+	+	+	+
XV	59, m.	109	—	+	+	+	+	+
XVI	53, m.	72	+	+	+	+	+	+
XVII	49, m.	56	—	+	+	+	+	+
XIX	45, w.	55	—	+	+	+	+	+
XX	51, w.	42 kach.	±	+	+	+	+	+
XXII	48, m.	77	Blut	+	+	+	+	+
XXIII	52, m.	63	—	+	+	+	+	+
XXIV	61, w.	62	+	+	+	+	+	+
XXV	47, m.	72	+	+	+	+	+	+
XXVII	8, m.	27	—	+	+	+	+	+
XXIX	34, m.	65	±	+	+	+	+	+
XXX	50, m.	83	—	+	+	+	+	+

Vorkommen der einzelnen Species bei 16 untersuchten Fällen

J = oberes Jejunum
I = Ileum
I 1 = oberes Ileum
I 2 = unteres Ileum
C = Caecum
C = Colon desc.
+ bis 200 Keime
++ bis 500 Keime
+++ bis 1000 Keime
++++ über 1000 Keime

Klinische Diagnosen:

III Fulminante Lungenarterienembolie, 16 Tage nach Magenresektion;
V Lungenödem bei Asthma cardiale et bronchiale;
VII Fr. Myocardinfarkt, Aortenstenose, bei Einlieferung gestorben;
XII Lebercirrhose und -carcinom, Leucocytose;
XV Herz-Kreislaufversagen bei Hypertonie, Adipositas;

wiegend aus Lebensmitteln isolierter Stämme. Bei den aus dem Darminhalt kultivierten Laktobazillen, insbesondere bei den L. acidophilus- und L. fermenti-Stämmen, zeigten sich etliche Besonderheiten. Vor allem aber ermög-

Dinn- als auch vom Dickdarm der Darmabschnitt mit jeweils der größten isolierten Menge der

L. ferm.	L. casei	L. plant.	L. brevis	Zahl der isol. Arten pro Person
Dinn-darm	Dinn-darm	Dinn-darm	Dinn-darm	
Dick-darm	Dick-darm	Dick-darm	Dick-darm	
[+]	[+]	[+]	[+]	5
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	5
Cae	Cae	Cae	Cae	
(+)	(+)	(+)	(+)	6
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	4
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	3
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	3
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	2
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	1
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	2
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	1
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	1
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	2
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	2
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	4
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	4
Cae	Cae	Cae	Cae	
[+]	[+]	[+]	[+]	1
Cae	Cae	Cae	Cae	

XVI Empyem nach Pneumonektomie;
XVII Schlafmittelvergiftung, mit Organschädigungen (Leber, Nieren, Herz), akutes Lg.-Ödem;
XIX Mitralstenose III mit Lg.-Ödem;
XX Mediast. Lymphome (Metast. Tonsillencarcinom Hypotonie;
XXII Thrombopenische haemorrhagische Diathese;
XXIII Kleinzelliges Bronchialcarcinom mit Hirnmetast.;
XXIV Vorderwandinfarkt mit Pleuropneumonie (wahrscheinlich Antibiotica);
XXV Herz-Kreislaufversagen bei Phenothiazinkur;
XXVII Herzversagen bei Op. einer erworbenen rheum. Mitralklappeninsuffizienz, zuvor Ascites;
XXIX Generalisierte Lymphogranulomatose mit akut cerebralem Bild;
XXX Herzruptur nach Infarkt mit Septumbeteiligung.

lichte die Untersuchung der von uns inzwischen in größerer Zahl isolierten *L. acidophilus*-Stämme eine genauere Beschreibung dieser Art als es in der vorher zitierten Arbeit mit zum großen Teil von anderen Untersuchern stammenden Kulturen möglich war.

Tabelle 6

Die in den untersuchten Darmabschnitten ermittelten pr-Werte bei Fällen ohne Nachweis von aeroben Laktobazillen

	Alter (Jahre)	Klin. Diagnose	J	I 1	I 2	Cae	C
I	33	Peritonitis	7,0	—	—	6,8	—
II	67	Urämie	7,7	8,0	7,0	7,5	—
IV	54	Urämie	6,6	7,5	8,0	8,5	—
VI	32	Encephalitis	6,7	7,0	7,2	7,5	—
VIII	77	Urämie	8,0	8,0	8,2	8,5	8,4
IX	85	Dekomp.					
X	83	Hypertonus	6,4	6,6	—	8,2	8,0
XI	77	Urämie	6,7	7,2	—	7,5	7,5
XII	78	Ak. Herzversagen	6,4	6,7	—	6,7	7,2
XIII		Herz-Kreislauf- versagen nach Magenperforation					
XIV	67	Insult mit Apoplektischer	7,0	8,4	8,0	8,5	8,0
XVIII	31	Hemiparese	6,2	6,6	7,0	8,4	8,0
XXI	35	Peritonitis	7,0	7,1	7,0	—	—
XXII	34	Mitralstenose III	6,0	5,7	6,0	7,0	7,2
XXVI		Leukopenie, Encephalitis, kurzer Tempera- turanstieg					
XXVIII	52	Herzversagen	6,1 6,4	6,6 6,5	6,4	7,2 7,0	7,4 7,0
pr-Grenzwerte der nicht urämischen, nicht septischen Fälle (Nr. IX, XI, XIV, XXI, XXVI, XXVIII)			6,0-6,4	5,7-6,7	6,0-7,0	6,7-8,4	7,2-8,0
Arithmetischer Mittelwert			6,25	6,45	6,55	7,41	7,46

Bei wiederholten Überprüfungen zeigte sich bei den in ihren Eigenschaften von dem bisherigen Differenzierungsschema abweichenden Stämmen eine Konstanz. Da solche Stämme nicht vereinzelt auftraten, sahen wir uns ge-
nötigt, unser Differenzierungsschema zu erweitern. Diese Stämme als neue Species zu deklarieren, erschien verfrüht. Aus diesem Grunde grenzten wir sie als Varianten der ihnen weitgehend entsprechenden Arten ab und teilten so einzelne Arten in Typen auf. Diese Typeinteilung kann nach weiteren taxo-
nomischen Studien möglicherweise durch eine Aufteilung in neue Species er-
setzt werden. Für die Auswertung der vorliegenden Untersuchungen war die
Typisierung von ausschlaggebender Bedeutung.

L. acidophilus trat danach in mehreren Typen mit verschiedenen bio-
chemischen und morphologischen Eigenschaften auf. Der am häufigsten isolierte
Typ I war stärker mikroaerophil als der Typ II und als alle übrigen gleichzeitig
im Darm vorhandenen Laktobazillenarten und wuchs auf aerob bebrütetem

Tabelle 7

Die in den untersuchten Darmabschnitten ermittelten pr-Werte bei Fällen mit Nachweis von aeroben Laktobazillen

	Alter (Jahre)	Klin. Diagnose	J	I 1	I 2	Cae	C
III	66	Lungenembolie, 16 Tage nach Magenresektion	6,2	6,3	6,7	7,0	—
V	63	Lungenödem bei Asthma,					
VII	40	Anus praeter (kachekt., 34 kg)	6,7	7,0	7,2	7,2	—
XII	51	fr. Myocardinfarkt	6,2	6,5	6,4	6,5	6,7
XV		Lebercarcinom und -cirrhose, Leukozytose (kachekt., 35 kg)	6,7	6,7	6,7	6,7	—
XVI	59	Herz-Kreislauf- versagen bei Hypertonie	6,2	6,2	6,0	6,8	7,2
XVII	53	Pneumonie nach Schlafmittelver- giftung mit Organschädigung	5,9	6,5	—	6,2	6,7
XIX	45	Lungenödem bei Mitralstenose III	6,0	6,4	6,0	6,8	7,0
XX	51	Metastas. Ton- sillencarcinom (kachekt., 42 kg)	6,2	6,8	7,0	7,8	7,0
XXII	48	Thrombopenische haemorrhagische Diathese	6,0	6,2	6,4	6,4	6,4
XXIII	52	Bronchial- carcinom mit Hirnmastasen	6,2	6,4	6,4	7,5	7,7
XXIV	61	Vorderwand- infarkt mit Pleurpneumonie	6,2	6,4	6,2	7,7	7,5
XXV	47	Herzversagen bei Phenothiazinkur	6,2	6,0	5,9	5,7	5,7
XXVII	8	Herzversagen bei Herzoperation	6,2	6,5	6,2	6,8	6,9
XXIX	34	Generalisierte Lymphogranulo- matose	6,1	6,1	6,7	6,2	6,5
XXX	50	Herzruptur nach Infarkt mit Septumbeteilig.	6,2	6,3	6,4	6,2	6,2

pr-Grenzwerte (mit Ausnahme der
kachekt. Fälle Nr. V, XII und XX
und des 6 Tage aufbewahrten Falles
Nr. XXVII)
Arithmetischer Mittelwert

5,9-6,2 6,0-6,5 5,9-6,7 5,7-7,7 5,7-7,7
6,1 6,3 6,3 6,65 6,77

Briggs-Sorbinsäure-Agar in kleinen, annähernd runden Kolonien mit relativ glatter Oberfläche, während Typ II in bedeutend größeren Kolonien mit gefurchter Oberfläche und haarlockenförmigen Ausläufern wuchs (Abb. 1). In anaerobem Milieu wuchs L. Typ I zu größeren und erhabeneren Kolonien heran, L. Typ II veränderte sich nicht in der Größe.

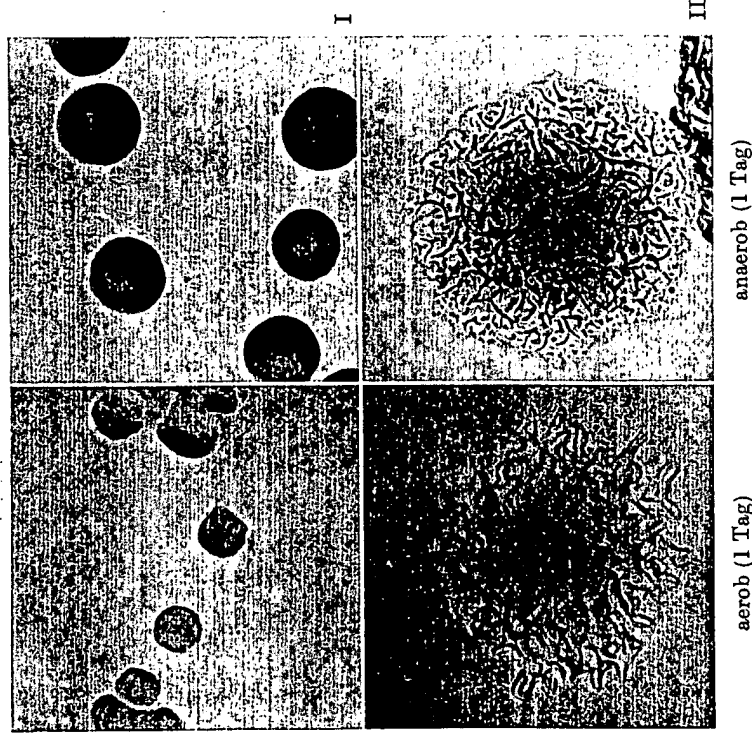


Abb. 1. *L. acidophilus*, Typ I und II (Vergr. 25 ×)

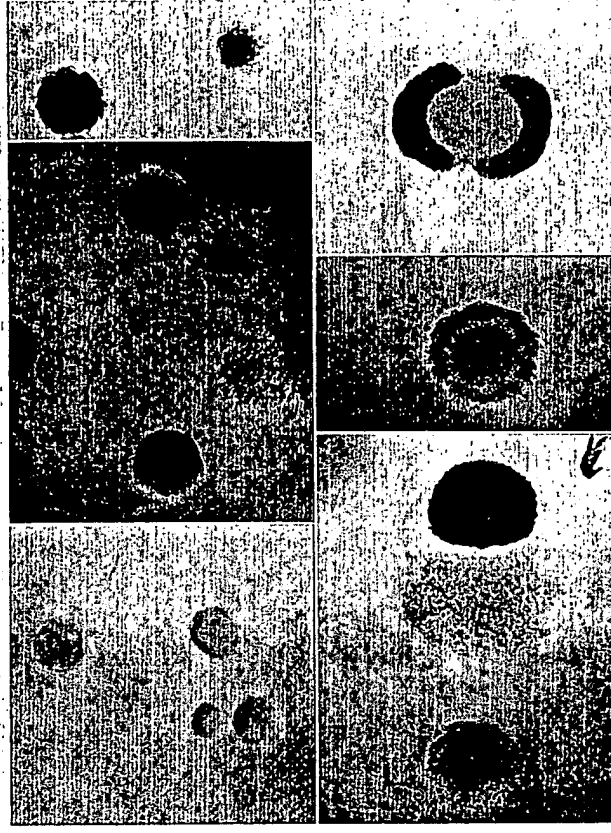
Bei der biochemischen Prüfung zeigte sich, daß der seltener vorkommende Typ II immer Raffinose angriff.

Ganz vereinzelt zeigten sich noch 2 weitere Typen: Von einem wurde biochemisch außer der Raffinose noch Melibiose angegriffen, von dem anderen konnte Trehalose nicht vergoren werden.

Typ I des *L. acidophilus* zeigte noch eine weitere Besonderheit. Bei der Kultivierung dieses Keimes entstanden auf den Platten Dissoziationsformen der Kolonien. Außer kleinen, runden, annähernd glatten waren einzelne Kolonien flacher, durchscheinender, unregelmäßiger begrenzt oder begannen, Ausläufer zu bilden, wiederum andere bildeten einen Wall, der aus neuen Tochterkolonien bestand. Diese Formen traten meist erst nach längerem Wachstum (2-3 Tage) auf (Abb. 2). Nach erneuter Überimpfung wuchsen auch die dissoziierten Kolonien zunächst wieder in der glatteren Form, um sich später aufzuspalten. Biochemisch verhielten sich aus verschiedenartigen Kolonien gewonnene Subkulturen gleich.

Auch keimmorphologische Unterschiede bestanden. Typ I wies meist längere Stäbchen auf als Typ II. Außerdem bestanden innerhalb des ersten Typs noch Unterschiede, bedingt durch die Dissoziationsformen. Die flacheren Kolonien in der R-Form zeigten vorwiegend mittellange einzeln liegende Stäbchen, die erhabeneren runden Kolonien enthielten vornehmlich längere Stäbchen und Fäden, die in miteinander verschlungenen Ketten lagen (Abb. 3).

1-2 Tage



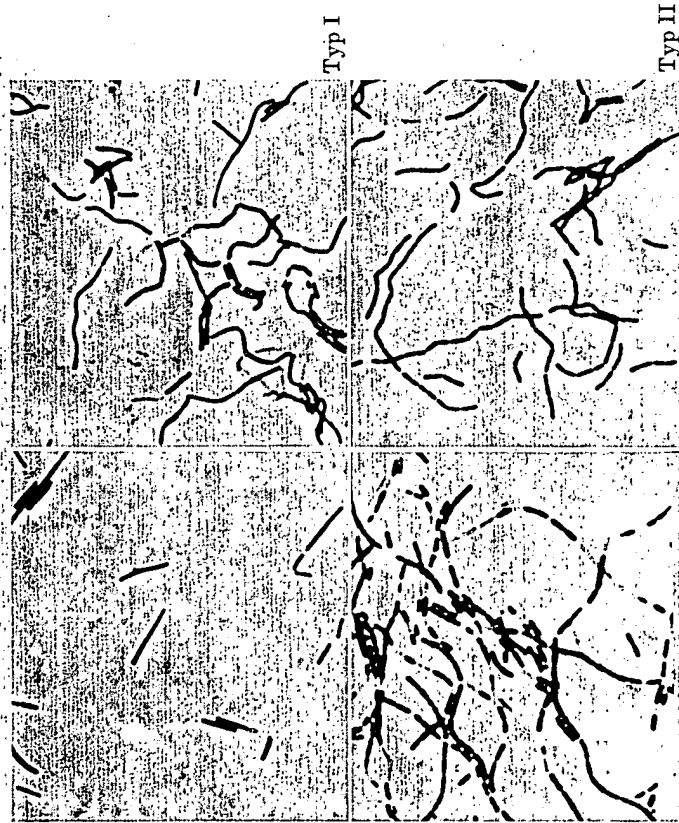
2-3 Tage

Abb. 2. *L. acidophilus*, Typ I (Vergr. 25 ×)
Dissoziationsformen auf Briggs-Agar (aerob)

L. salivarius, die von uns zuvor noch nicht beschriebene Art, trat in grauweißen, flachen, pastösen, meist verschiebbaren, sowohl in der S- als auch in der R-Form vorliegenden Kolonien auf (Abb. 4). Die Stäbchen lagen meist zu zweit hintereinander. Anfangs waren sie kurz; später konnten sie zu längeren und kräftigeren Stäbchen heranwachsen (Abb. 5). In ihrem biochemischen Verhalten erwiesen sich die isolierten Stämme gleich. Die zum Differenzieren benutzten Kriterien sind in Tabelle 8 enthalten.

Bei den zahlreich aus dem Darminhalt isolierten *L. fermenti*-Stämmen zeigten sich gegenüber den aus Lebensmitteln isolierten ebenfalls einzelne Abweichungen, die dazu führten, auch bei dieser Art von Typen zu sprechen. Wohl wurden auch aus dem Darminhalt viele Stämme isoliert, deren Eigenschaften mit den von uns seinerzeit gefundenen übereinstimmen, doch griffen etliche Stämme Arabinose an und behielten diese Fähigkeit bei Weiterzüchtung

auf künstlichen Nährmedien zum Teil über einige Passagen, zum Teil immer bei. In der Kolonieform waren sie flacher und durchscheinender und zeigten eine Vorliebe für saure Nährböden und für anaerobes Milieu. Außerdem zeigten sie bei 17°C noch kein Wachstum. Diese Eigenschaften behielten sie bei. Sie wurden zur Unterscheidung gegenüber dem häufigeren und mit I bezeichneten Typ als *L. fermenti* II geführt. Ein anderer Typ verhielt sich wie Typ I, vergor aber zusätzlich noch Trehalose, ein weiterer vermochte dagegen Melibiose und Raffinose nicht anzugreifen. Diese Stämme wurden *L. fermenti* III und IV genannt. Sie kamen nur selten vor.



aerob anaerob
Abb. 3. Keimmorphologie des *L. acidophilus* (Vergr.: 1200 ×)

Unter den *L. casei*-Stämmen zeigten sich einige, die Lackmuspilch nicht zu koagulieren und zu reduzieren vermochten. Bei 2 Personen wurden außerdem Stämme isoliert, die zusätzlich Raffinose angriffen.

Bei *L. plantarum* kamen 2 Typen vor, die sich nur in der Vergärung von Arabinose unterschieden.

Bei den isolierten *L. brevis*-Stämmen zeigten sich einige biochemische Variationen in Verbindung mit verschiedenen kolonienmorphologischen Eigenheiten. So vergoren die aus höheren Darmabschnitten isolierten Stämme durchweg Saccharose. Sie traten auch meist in der S-Form auf, die allerdings bei längerem Wachstum in die R-Form übergehen konnte. Die Einzelheiten sind aus Tabelle 8 zu entnehmen. Als *L. brevis* II wurden die vereinzelt vorkommenden Stämme, die Laktose anzugreifen vermochten, bezeichnet.

Von *L. buchneri* wurden nur wenige Stämme isoliert. Sie unterschieden sich von *L. brevis* dadurch, daß sie Raffinose angriffen. Es konnten auch hier zwei Typen festgestellt werden.



L. acid. (grau)
L. saliv. (weiß)
Abb. 4. 2 Stuhlprobenausschläge (Verdünnung 10⁻⁴, aerob)

Eine Zusammenstellung der zur Differenzierung benutzten physiologischen und biochemischen Merkmale der Laktobazillen ist in Tabelle 8 vorgenommen worden.

Bei der Kultivierung und Identifizierung der aeroben Laktobazillenarten konnten außer den morphologischen und biochemischen Besonderheiten auch noch andere wichtige Eigenschaften festgestellt werden.

So war für die Aufbewahrung der isolierten Stämme die Beobachtung wichtig, daß sich *L. acidophilus* und *L. salivarius* in Milch nicht länger als



1 Tag 2 Tage
Abb. 5. Keimmorphologie des *L. salivarius* (Vergr.: 1200 ×)

Tabelle 8. Zusammenstellung der zum Differenzieren benutzten physiologischen und biochemischen Kriterien

Subgenus (nach ORLA-JENSEN)	Species und Typen (* = die häufig angetroffenen)	Gas aus Gluk.	Wachstum bei		Verhalten in		Vergärung von Kohlehydraten											
			15°C	45°C	LM	MB	Arabinose	Glukose	Laktose	Saccharose	Maltose	Trehalose	Melthiose	Cellobiose	Raffinose	Mannit	Salizin	Aesculin
Thermo-bacterium	lactis	—	+	+	SKR	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	acid. I*	—	+	+	S	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	acid. II	—	+	+	S	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	acid. III	—	+	+	S	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	acid. IV	—	+	+	S	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
Strepto-bacterium	saliv.*	—	+	+	S	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	casei I*	—	+	+	SKR	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	casei II*	—	+	+	S	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	casei III	—	+	+	SKR	K	—	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	plant. I*	—	+	+	—	K	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
Betalbacterium	plant. II*	—	+	+	—	K	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	leichm.	—	+	+	—	K	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+
	brevis I *S-Form	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	brevis I *S-R-Form	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	brevis I R-Form	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	brevis II	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	buchneri I	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	buchneri II	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	form. I	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	form. II	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	form. III	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
	form. IV	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+

LM = Lackmusmilch

MB = Milch + 10% fl. Briggs-Medium

K = Koagulation

S = Säuerung

R = Reduktion

Ablesung nach 2 Tagen bei 37°C und 1 Tag bei 30°C.

++ = kräftige Reaktion

+ = schwache Reaktion

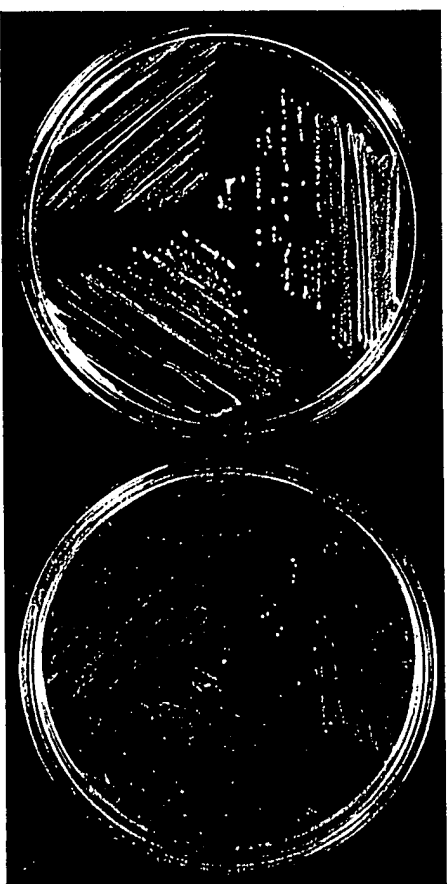
++ = verschiedene Reaktionen

— = keine Reaktion

3-5 Tage nach dem Anwachsen lebensfähig erhielten. Die übrigen Laktobazillen konnten dagegen in Milch bis zu 8 Wochen gehalten werden. Beide Arten wurden bisher nur aus der Darm- und Mundflora isoliert. Zufälligerweise wurde entdeckt, daß beide Arten in flüssigem Briggs-Medium, das wie üblich beimpft, jedoch nicht beimpft wurde, bei Temperaturen bis zu 15°C 6 bis 8 Wochen lebensfähig blieben, dies machte ihre Aufbewahrung sehr leicht. Die Röhren brauchten nur aus dem Kühlschrank genommen und einen Tag bebrütet zu werden. Diese Methode der Aufbewahrung erwies sich für die übrigen Laktobazillen ebenfalls als brauchbar und besser als die Aufbewahrung in Milch. In Briggs-Hochschicht-Agar mit 0,1% Glukose hielten sich *L. acidophilus* und *L. salivarius* nur 4 Wochen, die übrigen Laktobazillen jedoch bis zu 3 Monaten.

Die beiden vor allem im Darm vorkommenden Keime *L. acidophilus* und *L. salivarius* zeigten gegenüber den anderen aus dem Darm isolierten Laktobazillen deutliche Unterschiede bezüglich der Wachstumstemperaturen. Sie wuchsen weder bei 10, 15 noch bei 20°C und zeigten bei 30°C nur langsames und zahlenmäßig verringertes Wachstum. *L. fermenti* Typ I dagegen vermehrte sich schon bei 17°C, und *L. casei* und *L. brevis* vermehrten sich schon bei 10°C.

Auch die Entwicklung in sauren Medien (Briggs-Essigsäure Bouillon) wurde in vitro geprüft. Dabei ergab sich, daß *L. acidophilus* keineswegs der Laktobazillen-Keim ist, der im niedrigsten pH-Bereich zu wachsen imstande ist. Während sich einzelne Stämme von *L. brevis* bei einem pH-Wert von 3,5 schon vermehren konnten, zeigten alle anderen im Darm angetroffenen Stämme Wachstum bei einem pH-Wert von 4,0. Dieses Wachstum war bei einzelnen *L. acidophilus*- und den meisten *L. fermenti*-Stämmen nur schwach. *L. fermenti* Typ II dagegen wuchs besonders gut bei diesem pH-Wert.

Abb. 6. Wachstum von *L. acidophilus*

Bei dem vorwiegend angetroffenen *L. acidophilus* Typ I stellte sich eine Wachstumsabhängigkeit vom gasförmigen Milieu heraus. Sowohl bei normalem als auch bei auf 20 Torr herabgesetztem Luftdruck wuchsen die

Keime zu kleineren Kolonien heran als in einem Leuchtgasmilieu, das durch Einlassen von Leuchtgas in auf 20 Torr evakuierte Zeißler-Töpfe hergestellt wurde (Abb. 6). Ebenso verhielten sich noch *L. fermenti* Typ II und *L. leichmannii*. Die Kolonien der übrigen Laktobazillen zeigten miteinander Ausnahme keine Größenunterschiede. *L. plantarum* wuchs als einziger im Leuchtgasmilieu zu kleineren Kolonien als sonst heran. Bei *L. acidophilus* und *L. casei* bestand außerdem im Leuchtgasmilieu die Tendenz zur S-Form. Letzterer Keim konnte dabei ganz in dieser Form auftreten.

Bei der Untersuchung des Darminhaltes Verstorbener wurden sowohl gramnegative Anaerobier als auch anaerobe Laktobazillen in großer Zahl ermittelt. Dies wird Gegenstand einer weiteren Veröffentlichung sein.

Nach Abschluß der bisher beschriebenen Versuche wurde die Mundhöhle auf das Vorkommen von aeroben Laktobazillen untersucht, um etwaige Zusammenhänge zwischen dieser Flora und der des oberen Dünndarmes festzustellen. Dabei konnten in der Mundhöhle nahezu regelmäßig die 3 Arten *L. acidophilus*, *L. salivarius* und *L. fermenti*, und zwar recht häufig in verschiedenen Typen, ermittelt werden.

Darüber wird ebenfalls in einer besonderen Arbeit berichtet werden.

Besprechung der Ergebnisse

Bei unseren Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die im Darminhalt aerob wachsenden Laktobazillen bei einer qualitativen Bestimmung sich nicht nur als *L. acidophilus*, sondern als eine ganze Gruppe von Laktobazillen erwiesen. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren gemacht, die sich eingehender mit diesem Problem beschäftigten (ORLA-JENSEN, 1919, MAURER, 1929, HENNEBERG, 1934/35). Ein Vergleich der von uns ermittelten Befunde mit denen der genannten Autoren erweist sich im einzelnen jedoch als schwierig, weil eine andere Methodik und eine andere Terminologie benutzt wurden. Unsere jetzigen qualitativen Aussagen wurden unter Berücksichtigung der inzwischen durch neuere Arbeiten (ROGOSA und Mitarb., 1953, BRIGGS, 1953b, WHEATER, 1955a, b; SHARPE und MATTICK, 1957, KUNDRAAT, 1958, LÖRCH und REUTER, 1960) verbesserten Differenzierungsmethodik und der im Bergeys Manual (1957) angeführten Terminologie getroffen.

Wir richteten unser Augenmerk jedoch auch auf eine quantitative Bestimmung der einzelnen Laktobazillenarten, denn die aeroben Laktobazillen können nur dann innerhalb der Darmflora von Bedeutung sein, wenn sie auch im Vergleich mit anderen Darmkeimen in entsprechender Menge im Darminhalt vorkommen. Als Vergleichskeim nahmen wir *E. coli*, der seit jeher als wichtiger Darmbewohner und sogar als Indikator für eine „physiologische“ Darmflora angesehen wird. Wir arbeiteten deshalb bei der Isolierung mit Verdünnungsstufen von 10^{-4} und 10^{-5} , innerhalb derer auch der *E. coli*-Anteil zahlenmäßig erfaßbar ist. Dabei zeigten die einzelnen Laktobazillenarten unterschiedliches Verhalten im menschlichen Darmkanal, die durch die verschiedenen Untersuchungsmethoden – stichprobenweise Stuhlproben bei normaler Ernährung, Untersuchung höherer Darmabschnitte post mortem, Prüfung der Reisolierbarkeit aus Stuhlproben nach oraler Einnahme der betreffenden Arten – eingehend geklärt werden konnten. Dieses Verhalten soll hier im einzelnen besprochen werden.

Die wichtigste Art ist *L. acidophilus*. Sie konnte von uns in stichprobenweise entnommenen Stuhlproben nicht oft und im positiven Fall auch nicht in größeren Mengen nachgewiesen werden. Dies erschien uns befremdlich, da doch dieser Keim von vielen Autoren als der eigentliche aerobe Darm-Laktobacillus angesehen wird. Deshalb nannten ihn ORLA-JENSEN und Mitarb. (1935/36) auch *Thermobacterium intestinale*. Im Jahre 1945 wurde von ORLA-JENSEN und Mitarb. jedoch einschränkend angeführt, daß Tbm. intestinale in Stuhlproben nicht in genügenden Mengen angetroffen wird, um ihn als Indikator-Keim für eine physiologische Darmflora werten zu können.

Andere Untersucher ermittelten ihn immer wieder, weil sie als Methode zur Isolierung häufig die Anreicherung in flüssigen sauren Medien anwandten, bei der die gramnegative Stuhlflora gehemmt wurde und nur die säuretoleranten Keime sich entwickeln konnten (MORO, 1900, ORLA-JENSEN, 1919, DRUCKREY, 1928, MAURER, 1929, ORLA-JENSEN und Mitarb., 1935/36). Selbst ORLA-JENSEN und Mitarb. gaben 1945 noch an, daß Tbm. intestinale oft nur durch Anreicherung kultiviert werden konnte.

Bei der Anwendung der sauren Anreicherung war aber nur das qualitative Vorkommen im Probenmaterial zu ermitteln, die Relationen zu den anderen möglicherweise gleichfalls vorkommenden Laktobazillenarten wurden aber völlig verschoben. Wir legten jedoch Wert auf die Ermittlung der zum Zeitpunkt der Probenentnahme bestehenden zahlenmäßigen Keimverhältnisse und arbeiteten deshalb mit dem Plattenverfahren. Um den stärker ausgeprägten mikroaerophilen Bedürfnissen des *L. acidophilus* Rechnung zu tragen, brüteten wir neben der normalen aeroben Plattenreihe eine zweite in dem für den *L. acidophilus* günstigen Leuchtgasmilieu. Damit war die Gewähr gegeben, daß dieser Keim nicht durch eine geringere Anwachsrate der Feststellung entgegen.

Die von uns gemachte Beobachtung, daß *L. acidophilus* bei vermehrter Peristaltik und beschleunigtem Stuhlgang fast immer in größerer Zahl nachzuweisen ist, wurde in der Literatur noch nicht eindeutig zum Ausdruck gebracht. Nur ORLA-JENSEN und Mitarb. (1945) führten an, daß während der länger dauernden Verabreichung von „Bifidum-Milch“ plötzlich Tbm. intestinale in großer Zahl auftrat und CARRAZ und Mitarb. (1960b) stellten fest, daß *L. acidophilus* bei Verabreichung von „Acidophilus-Milch“ plötzlich im Stuhl auftreten und das Bild beherrschen kann. In beiden Fällen wurde eine Sauermilch verabreicht, die peristaltikfördernd wirkt.

Das vermehrte Auftreten dieses Keimes bei beschleunigter Darmpassage deutet darauf hin, daß *L. acidophilus* in höheren Darmabschnitten zahlreicher vorhanden ist und während der normalen, langsamen Dickdarmpassage zum großen Teil abstirbt. Auf diesen Umstand weisen auch die Ergebnisse unserer Ansiedlungsversuche hin, denn *L. acidophilus* war nach oraler Einnahme, ganz im Gegensatz zu den anderen Laktobazillenarten, aus Stuhlproben nur vereinzelt zu reisolieren.

Bei einem von G. HENNEBERG (1940) an Dyspepsie-kranken Säuglingen und Kleinkindern durchgeführten Therapieversuch mit Verabfolgung von *L. acidophilus* konnte trotz teilweiser klinischer Heilerfolge nur eine vorübergehende Ansiedlung der Keime nachgewiesen werden. Von CARRAZ und MOULIN (1958b) konnten antibiotikaresistente *L. acidophilus*-Stämme nach 5-tägiger oraler Verabreichung im Stuhl in reichlicher Menge nachgewiesen werden. 1960 berichteten CARRAZ und Mitarb. über fortgesetzte Versuche mit Einnahme von

„Acidophilus-Milch“. Bei 8 von 31 untersuchten gesunden Erwachsenen traten die Keime im Stuhl auf, in 4 Fällen waren sie dominierend. Bei 7 von 20 gesunden Kindern bis zu 3 Jahren erschien *L. acidophilus* im Stuhl und in einigen Fällen trat er plötzlich auf und dominierte dann.

Das zeigt aber, daß, ähnlich wie bei unseren Fütterungsversuchen, *L. acidophilus* nur zu einem Teil im Stuhl nachweisbar wird. Nach unseren Ermittlungen muß die Schnelligkeit der Dickdarmpassage bei der Nachweisbarkeit des *L. acidophilus* im Stuhl mit in Betracht gezogen werden, und die mangelnde Nachweisbarkeit ist nicht mit einer mangelnden Ansiedlung gleichzusetzen. Eine Bestätigung dafür, daß *L. acidophilus* in höheren Darmabschnitten vorhanden sein kann, ohne im Inhalt des unteren Dickdarmes nachweisbar zu sein, brachten uns die Untersuchungen an Verstorbenen.

Dabei konnte über die Lokalisation des *L. acidophilus* im Darm in Erfahrung gebracht werden, daß nur das untere Ileum und das Caecum als der eigentliche Sitz und die konstante Vermehrungsstätte anzusehen sind, denn in den oberen und mittleren Dünndarmabschnitten fanden sich, wenn diese keinen Chymus enthielten, nur wenige oder gar keine derartigen Keime, und im Dickdarm nahmen sie nach dem Rectum hin ab.

Diese Befunde lassen sich nur in bestimmter Hinsicht mit Angaben anderer Autoren vergleichen; denn bei den von ihnen früher vorgenommenen Untersuchungen des Dünndarmes mit Hilfe von Sonden oder bei Leichen wurde immer nur die Laktobazillen-Gruppe, aber nicht speziell der *L. acidophilus* identifiziert. Verschiedene Autoren stellten jedoch ebenfalls im unteren Ileum ziemlich regelmäßig Laktobazillen fest (VAN DER REIS, 1925, BOGENDÖRFER, 1924, HAENEL und MÜLLER-BEUTHOW, 1958, HENNING und Mitarb., 1959). Die mittleren und oberen Dünndarmabschnitte waren von CREGAN und Mitarb. (1953) bei nüchternem Zustand der Patienten als sehr keimarm angetroffen worden, d. h., daß auch *L. acidophilus* nicht vorhanden war, wobei man allerdings die nicht optimale Technik der Anzüchtung für *L. acidophilus* berücksichtigen muß.

Wir sahen uns veranlaßt, auf eine Zuführung des *L. acidophilus* mit dem Speisebrei in die oberen und mittleren Dünndarmabschnitte zu schließen, denn wenn diese mit Chymus gefüllt waren, konnten auch immer zahlreiche *L. acidophilus*-Keime nachgewiesen werden. Im leeren Dünndarm jedoch waren diese Keime mit unserer Methode nicht nachweisbar. Da von uns *L. acidophilus* in der Mundflora regelmäßig angetroffen wurde, folgern wir, daß eine Zuführung aus der Mundhöhle stattfindet. Außerdem traten im Dünndarmchymus auch biochemische Typen auf, die sonst nur in der Mundhöhle gefunden wurden.

Möglicherweise verbleibt aber auch beim Fasten in diesen Dünndarmabschnitten immer noch ein geringer, mit unserer Methode nicht nachweisbarer Restbestand von *L. acidophilus*, der sich bei dem Hinzukommen von Chymus, d. h. eines guten Nährbodens, vermehren kann. Die schnelle Dünndarmpassage spricht jedoch gegen eine ausschließliche Vermehrung weniger seßhafter Keime.

In der Literatur wurde von CREGAN und Mitarb. (1953a) darauf hingewiesen, daß die Flora der höheren und mittleren Dünndarmabschnitte viel mehr der des Mundes als der des Dickdarmes gleicht.

Für die Möglichkeit der Zuführung sprechen experimentelle Befunde über die Resistenz von *L. acidophilus* gegenüber verschiedenen biologischen Substraten (CARRAZ und MOULIN, 1958a). Die Keime blieben in Magen- und Duo-

denalsaft, in Galle und in Faeces, bei 20°C in vitro aufbewahrt, 2 Tage am Leben. In weiteren Untersuchungen dieser Autoren (1958b) wurde bewiesen, daß oral zugeführte *L. acidophilus*-Keime die Magen- und Darmpassage überstehen können.

Neu war die Isolierung des *L. salivarius* aus dem Darminhalt. Diese Keimart wurde von uns bei stichprobenweise entnommenen Stuhlproben selten, bei den planmäßig während der Einnahmeversuche von laktobazillenhaltiger Nahrung und Laktobazillen-Reinkulturen entnommenen Proben jedoch als Begleitkeim sehr oft angetroffen. Als oral zugeführte Keimart konnte sie aber auch nur selten reisoliert werden. Dieses Verhalten ist dem des *L. acidophilus* analog.

Bei der Untersuchung höherer Darmabschnitte wurde *L. salivarius* sowohl im Dünndarm, hier vor allem in höheren Abschnitten, die mit Chymus gefüllt waren, als auch im Dickdarm, hier vor allem im Caecum, angetroffen, jedoch nicht so oft wie *L. acidophilus*.

In der Mundhöhle wurde diese Keimart von uns regelmäßig gefunden. Dieser Keim muß also auch aus der Mundhöhle zugeführt werden, sich jedoch nur vorübergehend im Darm vermehren können. Auf der normalen Passage durch das Colon scheinen diese Laktobazillen ebenso wie die *L. acidophilus*-Keime zum großen Teil abzusterben, denn eine vermehrte Peristaltik läßt auch sie in Stuhlproben schubartig in größerer Zahl auftreten.

L. salivarius wurde in der Literatur bisher nur von ROGOSA und Mitarb. (1953) in der Mundflora, und zwar als neue Species, beschrieben.

Eine Laktobazillenart, die in den Proben häufig und dann auch in größeren Mengen vorkam, war *L. fermenti*. Schon bei der normalen Stuhluntersuchung konnte sie am häufigsten von allen Laktobazillenarten ermittelt werden. Nach oraler Einnahme war sie gut reisolierbar. Häufig wurde sie aber auch bei laktobazillenfreier Nahrung aus Stuhlproben isoliert. Es mußte also entweder eine konstante Vermehrungsmöglichkeit im Darm bestehen, oder es mußte noch eine andere Quelle als die Nahrung vorhanden sein. Es stellte sich bei den später erfolgten Untersuchungen heraus, daß auch diese Art regelmäßig in der Mundhöhle vorkam. Durch diese zwei wichtigen Quellen und die Vermehrungsfähigkeit im Darm ist das häufige Auftreten dieser Keimart im Darm zu erklären. Dadurch, daß sie im Verlauf der normalen Colonpassage nicht so schnell abstirbt wie *L. acidophilus* und *L. salivarius*, tritt sie in Stuhlproben als häufigste Laktobazillenart auf.

Über die Isolierung des *L. fermenti* aus Stuhlproben liegen in der Literatur bereits Angaben vor (ORLA-JENSEN, 1919, MAURER, 1929, W. HENNEBERG, 1934/35). Damals wurde diese Art noch *Betabacterium longum* genannt. In den beiden letztgenannten Arbeiten wird auch über Ansiedlungsversuche berichtet. So bezeichnete MAURER diesen Keim als eine endemische Art, weil sie bei allen seinen Versuchspersonen vorkam und durch entsprechende Nahrung zu vermehren war. W. HENNEBERG konnte diesen Keim im Experiment nach 3 tägigem reichlichem Genuß von Käse, der diesen Keim enthielt, am 14. Tage nach Versuchsbeendigung noch aus den Faeces isolieren.

In der Mundflora wurde *L. fermenti* von ROGOSA und Mitarb. (1953) auch schon ermittelt, und zwar wurden 30,8% der aus der Mundflora isolierten 500 Stämme als diese Art identifiziert.

Mit den Arten *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis* verhält es sich ähnlich wie mit *L. fermenti*. Sie lassen sich nach oraler Einnahme gut reisolieren,

sind im Darm jedoch nur vorübergehend vermehrungsfähig, was an dem nur einige Tage anhaltenden Auftreten in Stuhlproben nach oraler Einnahme zu erkennen ist. Daß sich auch Keime dieser Arten möglicherweise länger im Darm halten, ist nach dem veränderten biochemischen Verhalten einiger aus höheren Darmabschnitten isolierter Stämme anzunehmen. Im übrigen müssen sie, da sie in der Mundflora von uns kaum nachgewiesen werden konnten, dem Darm in beträchtlichen Mengen mit der Nahrung zugeführt werden, in der sie auch zahlreich vorhanden sein können.

Über eine vorübergehende Vermehrungsfähigkeit von Streptobakterien im Darm war auch von W. HENNEBERG (1934/35) schon berichtet worden. In einem Versuch waren die Keime nach einem „Käsetag“ bei fortgesetztem Milchgenuß zahlreich in den Faeces nachzuweisen, nahmen nach 6 Tagen an Zahl ab und waren nach 7–8 Tagen kaum noch vorhanden. Bei Einnahme einer *L. casei*-Reinkultur waren diese Keime nur noch 2 Tage nach Versuchsbeendigung vorhanden.

Rogosa und Mitarb. (1953) fanden zwar diese Keimarten häufiger in der Mundflora als wir, doch geht aus ihren Befunden nicht hervor, ob sie die Beeinflussung durch die Nahrungsflora berücksichtigt haben. Wir ermittelten unsere Befunde aus Probenmaterial, das frühmorgens nüchtern und vor dem Zähneputzen entnommen worden war und das so weitgehend frei von Nahrungsresten war.

Bei unseren Stuhlprobenuntersuchungen fanden wir nur gelegentlich einmal *L. lactis*, *L. leichmannii* und *L. buchneri*.

L. lactis konnte auch nur ganz selten aus Nahrungsmitteln und nicht aus der Mundflora isoliert werden. Wir prüften deshalb auch seine Vermehrungsfähigkeit im Darm nicht.

L. buchneri und *L. leichmannii* kamen in der gewöhnlich aufgenommenen Nahrung auch nicht oft vor. Bei den durchgeführten Ansiedlungsversuchen erwies sich erstere Art als gut, letztere als überhaupt nicht reisolierbar. Damit ist auch das seltene Vorkommen von *L. leichmannii* in Stuhlproben erklärlich.

Von MAURER (1929) wurde *L. lactis* als Passant bezeichnet, also als ein Keim, der nur durch den Darmkanal „hindurchrutscht“. W. HENNEBERG (1934/35) prüfte die Vermehrungsfähigkeit im Darm und konnte feststellen, daß noch 5 Tage nach der letzten Einnahme diese Keime im Stuhl nachweisbar waren. Er ermittelte auch bei *L. helveticus* ein ähnliches Verhalten.

Über die Isolierbarkeit aus Faeces und die Vermehrungsfähigkeit im Darm liegen für die Arten *L. leichmannii* und *L. buchneri* in der Literatur keine Angaben vor.

Entspricht nun der an Leichen erhobene Befund überhaupt den physiologischen Bedingungen und darf er zu Aussagen über die Darmflora herangezogen werden? Diese Frage wird von uns beantwortet, denn die unterschiedlichen Befunde je nach Lagerung der Fälle lassen gewisse Rückschlüsse zu. Alle Fälle mit plötzlichem Exitus zeigten untereinander große Ähnlichkeit aber grundsätzliche Unterschiede gegenüber den Fällen, bei denen der Tod infolge hohen Alters, nach längerem Krankenlager, nach septischen, toxischen und kachektischen Erkrankungen eintrat.

Von den vorzugsweise zur Auswertung herangezogenen Fällen mit akutem Herzversagen ist mit großer Wahrscheinlichkeit als sicher anzunehmen, daß zum Zeitpunkt des Todes im Darm physiologische Verhältnisse vorlagen. Daß im Darminhalt vom Zeitpunkt des Todes bis zur Untersuchung bei kühler

Lagerung eine wesentliche Verschiebung der Keimrelationen eintrat, ist nicht wahrscheinlich. So hatten HAENEL und MÜLLER-BEUTHOW (1958) an Stuhlproben nachgewiesen, daß unter Kühlung bei 4°C erst ab 6 Tagen eine Veränderung der Keimrelationen festzustellen war und bei einer Aufbewahrung bei 15 und 25°C noch nach 24 Std. das ursprüngliche Bild erkennbar war. Unsere Probenentnahmen erfolgten durchschnittlich 24–48 Std. p. m.

In der Literatur liegen Angaben sowohl über Untersuchungen an Verstorbenen als auch an Lebenden vor. VAN DER REIS (1925) stellte eine weitgehende Übereinstimmung der Befunde, die von anderen Autoren an der Leiche erhoben worden waren, mit den von ihm mit Hilfe von Darmproben an Lebenden ermittelten Ergebnissen fest. BOGENDÖRFER (1924) hatte mit Kapseln ähnliche Befunde wie VAN DER REIS ermittelt. Diese und auch die Ergebnisse neuerer Untersuchungen an Lebenden (CREGAN und Mitarb., 1953, HENNING und Mitarb., 1959) und an Verstorbenen (HAENEL und Mitarb., 1958) stehen nicht im Widerspruch zu unseren Befunden. Sie sind jedoch nicht im einzelnen mit unseren Untersuchungsergebnissen vergleichbar, weil alle Autoren sich nur mit der Identifizierung von Keimgruppen, aber nicht von einzelnen Species der Laktobazillen-Gruppe beschäftigten. Außerdem wurde zum Teil nur bakterioskopisch untersucht, oder es wurden Nährböden angewandt, die nicht dazu angetan waren, die langsam wachsenden und anspruchsvollen Laktobazillen entsprechend zu kultivieren. Selbst CREGAN und Mitarb. (1953) verwendeten noch Würze-Agar, der nach unseren Untersuchungen (1960) als unzulänglich für die Kultivierung der in Frage kommenden Laktobazillenarten anzusehen ist. Nur HAENEL und Mitarb. (1958) und HENNING und Mitarb. (1959) benutzten geeignete Medien.

Es besteht deshalb kein Anlaß, die von uns an Leichen ermittelten Befunde als unphysiologisch anzuzweifeln, solange noch keine entsprechenden detaillierten Untersuchungsergebnisse von lebenden Individuen vorliegen.

Die pH-Messung ergab in den von uns untersuchten Darmabschnitten bei Laktobazillennachweis durchschnittlich niedrigere Werte als bei Fällen ohne Laktobazillennachweis. Da wir das Vorhandensein von Laktobazillen im Darm als physiologisch ansehen können, dürfen wir auch die bei diesen Fällen ermittelten Werte mit einzelnen Ausnahmen als allgemeingültig betrachten. Danach und nach einzelnen auswertbaren Fällen, die keine Laktobazillen enthielten, waren die Werte im oberen Jejunum ziemlich konstant und betrugen durchschnittlich pH 6,2. Im oberen und unteren Ileum stiegen die Durchschnittswerte auf etwa pH 6,4 an, wobei die Grenzwerte nach dem Dickdarm zu immer weiter auseinanderlagen. Im Dickdarm divergierten die Grenzwerte noch weiter, entweder nach der alkalischen oder nach der sauren Seite hin.

Angaben über pH-Werte in verschiedenen Darmabschnitten wurden von VAN DER REIS (1925) auf Grund seiner Kapseluntersuchungen an 63 Normalpatienten im ingesta-freien Dünndarm gemacht. Er errechnete für den oberen Dünndarm einen Durchschnittswert von 6,28, für den mittleren einen solchen von 6,46 und für den unteren einen von 6,79. Nach Aufnahme von kohlehydratreicher Nahrung fiel der pH-Wert im oberen Dünndarm nach 2 Std. auf pH = 6,0 und im unteren Dünndarm nach 5 Std. auf pH = 6,4. Das entspräche unseren Ergebnissen, besonders auch in den Fällen, bei denen von uns im Dünndarm Ingestamassen festzustellen waren.

Die Übereinstimmung unserer Werte mit denen von lebenden Normalpatienten bestätigt uns erneut, daß unser Probenmaterial weitgehend den

physiologischen Bedingungen entsprach und für eine Anerkennung der Ergebnisse dieser post mortem-Untersuchungen keine Bedenken bestehen.

Wir erhielten durch unsere Untersuchungen auch Hinweise, daß der Dünndarm eine „autosterilisierende“ Wirkung besitzen müsse. Wie schon früher erwähnt, erwiesen sich bei den als physiologisch anzusehenden Fällen die oberen und mittleren Abschnitte des Dünndarmes nicht als geeignete Milieu für eine konstante Besiedlung mit Keimen. Sie ließen nur bei Anwesenheit von Chymus eine Vermehrung von Laktobazillen und Streptokokken, die aus Nahrung, Mund und Magen zugeführt werden, erkennen. Im unteren Ileum bestand dagegen eine konstantere Flora, die der Caecalflora ähnlich war, d. h., daß neben aeroben Laktobazillen und Streptokokken auch schon *Coli*-, *Bacteroides*- und *Bifidus*-Keime anzutreffen waren.

In zahlreichen Arbeiten wird von einer Autosterilisation oder Autoinfektion des Dünndarmes gesprochen. GANTER und VAN DER REIS (1921) stellten fest, daß der Darmsaft eine bakterizide Eigenschaft besitzt. Künstlich eingebrachte, nicht darneigene Keime wurden im Dünndarm abgetötet. 1925 berichtete VAN DER REIS von seinen weiteren Untersuchungen, denen zufolge der Dünndarm relativ keimarm und arm an Arten war. Dabei war von oben nach unten eine Abnahme der Kokken und grampositiven Stäbchen und eine Zunahme der gramnegativen Keime festgestellt worden. BOGENDÖRFER und BUCHHOLZ (1923) fanden an umschriebenen Stellen des Dünndarmes Keimfreiheit, und 1924 teilte BOGENDÖRFER seine Feststellung über die bakterizide Wirkung des Dünndarmsaftes und über ähnliche Keimverhältnisse, wie sie VAN DER REIS beschrieb, mit. Auch CREGAN und HAYWARD (1953) folgerten auf Grund ihrer durch Darmpunktion bei Operationen erhaltenen Befunde, daß ein antibakterieller Mechanismus im Dünndarm vorhanden sein müsse. Eine grampositive, aus viel Streptokokken und weniger Stäbchen bestehende Flora, die näher der des Mundes als der des Dickdarmes verwandt sei, könne sich nur vorübergehend im Dünndarm halten. Mundhöhle und Dickdarm, die auch untersucht wurden, zeichneten sich durch eine konstante Flora aus. CREGAN, DUNLOP und HAYWARD (1953b) prüften auch den Einfluß mangelhafter Magenfunktion auf die Dünndarmflora. Weder wenig Magensäure noch eine zahlreiche Magenflora führten zu einer dauerhaften bakteriellen Dünndarmsiedlung. Der antibakterielle Dünndarmmechanismus erschien daher als unabhängig von der keimhemmenden Magenschranke.

HENNING und Mitarb. (1959) fanden das mittlere und untere Ileum verschieden stark besiedelt, wobei Keimfreiheit und starke Besiedlung abwechseln konnten. Im unteren Ileum fanden sie vorwiegend Laktobazillen, Streptokokken, *E. coli*- und *Bacteroides*-Keime.

Alle in der Literatur über die Dünndarmbesiedlung und über die bakteriellen Eigenschaften der Dünndarmsekrete gemachten Angaben zeigen eine gewisse Übereinstimmung mit unseren Befunden. Von besonderem Interesse jedoch sind die Ermittlungen von CREGAN und Mitarb. (1953a, b), daß die Dünndarmflora in den oberen Abschnitten weitgehend der Flora des Mundes ähnelt. Nach diesen Feststellungen und auf Grund unserer Befunde kann also gesagt werden, daß das Auftreten von Keimen im Dünndarm in starkem Maße von einer Zuführung aus der Mund- und Nahrungsmittelflora abhängt, wobei eine starke Vermehrung bei Anwesenheit von Chymus besteht. Das untere Ileum macht dabei eine Ausnahme, indem hier schon eine beständige Flora vorhanden ist, die eine Übergangsform zur Dickdarmflora darstellt.

Das Verhalten der Coliflora in Faecesproben während der Versuche ist besonders erwähnenswert. Die *E. coli*-Keime wurden bei Einnahme von stark milchsäure- und laktobazillenhaltigen Nahrungsmitteln zahlenmäßig stark zurückgedrängt und traten bei einzelnen Personen nur noch in Form des laktosenegativen sogenannten „Paracoli“ auf. Einige Tage nach Absetzen der Versuchsnahrung erholte sich die Flora wieder, und es lagen nur noch laktosepositive *Coli*-Keime vor.

Die als „Paracoli“ isolierten Keime erlangten nach mehreren Passagen über Drigalski-Agar auch ihr Laktosevergärungsvermögen zurück.

Auch W. HENNEBERG (1934/35) bemerkte bei seinen Ansiedlungsversuchen einen vorübergehenden Schwund der Coliflora.

Infolge der großen Zahl isolierter und differenzierter Laktobazillenstämme konnten wichtige Einzelheiten über die einzelnen im Darm vorkommenden Laktobazillenarten ermittelt werden, die zu einer genaueren Kenntnis der Laktobazillengruppe beitragen.

Besonders die Differenzierungsmerkmale für den *L. acidophilus* konnten genauer definiert werden als das bei unserer vorhergehenden methodischen Arbeit (LERCHE und REUTER, 1960) möglich war.

Bei unseren jetzt beschriebenen Stämmen kristallisierten sich vier Typen heraus, wobei der am stärksten sauerstoffempfindliche Typ I sowohl in der Darm- als auch in der Mundflora fast immer vorherrschte.

Typ II trat bedeutend weniger auf, und nur vereinzelt kamen Typ III und IV vor.

In der neueren Literatur wurde ebenfalls das Vorkommen verschiedener Typen erwähnt. So berichteten ROGOSA und Mitarb. (1953) auf Grund ihrer Untersuchungen der Mundflora, daß *L. acidophilus* in vier Typen auftrat, und zwar zu 80% in der Form, die unserem ebenfalls vorherrschenden Typ I entspricht, zu 14% in der Form, die unserem Typ II in den Merkmalen und auch in der Häufigkeit des Auftretens entspricht und zu 2% in der Form, die unserem Typ III entspricht. Der Typ IV der genannten Autoren sollte sich nur durch S-Form-Kolonien vom Typ I unterscheiden.

Wir haben jedoch festgestellt, daß Typ I in der Kolonieförmigkeit dissoziieren kann. Eine Aufteilung in weitere Typen erscheint jedoch nicht gerechtfertigt, da sich Subkulturen dieser dissoziierten Kolonien biochemisch und physiologisch gleich verhielten.

Dissoziationen bei *L. acidophilus* waren in der Literatur auch früher schon beschrieben worden. KOPLOFF (1934) befaßte sich experimentell mit diesem Problem und versuchte, in der S- und in der S-R-Form auftretende Stämme in konstante R-Form zu überführen, was ihm allerdings nicht gelang.

Unser Typ IV, der ganz vereinzelt vorkam und den wir besonders abgrenzten, vermochte zwar Raffinose, aber nicht Trehalose zu vergären. Über ein solches Verhalten wurde auch schon von WHEATER (1955) berichtet. Weiterhin besagen die Angaben von WHEATER und die von DAVIS (1955), daß es *L. acidophilus*-Typen gibt, die in der Vergärung von Raffinose, Melibiose und Salizin differieren. Eine Vergärung von Salizin wurde von uns jedoch nicht festgestellt.

Die von uns isolierten *L. salivarius*-Stämme zeigten von allen Laktobazillenarten biochemisch und physiologisch die konstantesten Merkmale. Nur koloniemorphologisch unterschieden sich Stämme in der R-Form von solchen

in der S-Form. Die von Rogosa und Mitarb. (1953) beschriebene Varietät, die Salizin vergären konnte, wurde von uns nicht beobachtet.

Die beiden bisher besprochenen Arten *L. acidophilus* und *L. salivarius* unterscheiden sich aber in ihrem physiologischen Verhalten deutlich von den anderen Laktobazillenarten. Sie wuchsen beide nicht in Temperaturen bereichen von 15–20°C, aber optimal bei 37°C. Sie konnten beide nicht, wie die übrigen Arten, in Milch aufbewahrt werden. Sie wurden auch nicht, wie die übrigen Arten, in Lebensmitteln gefunden, sondern konstant in der Mundhöhle. Folglich kann man sie als die beiden aeroben Laktobazillenarten bezeichnen, die den menschlichen Digestionstrakt besiedeln.

Eine Zwischenstellung zwischen diesen und den Laktobazillen der Lebensmittel nimmt *L. fermenti* ein. Diese Art konnte konstant in der Mundhöhle, aber auch weit verbreitet in Lebensmitteln angetroffen werden. In Stuhlproben war er der am häufigsten angetroffene Lactobacillus, im Inhalt höherer Darmabschnitte war er ebenso häufig wie *L. acidophilus* und auch fast immer mit diesem zusammen nachzuweisen. Es zeigten sich bei dieser Art jedoch neue Typen, die wir bei den früher aus Lebensmitteln isolierten Stämmen noch nicht beobachtet hatten. So traten sehr oft Stämme auf, die Arabinose angriffen. Die Kolonien waren grau und flach. Sie wuchsen besser auf saurem Nährboden ($pH = 5,0$) als auf fast neutralem ($pH = 6,8$) und auch besser anaerob als aerob, so daß sie von dem bisher bekannten *L. fermenti* deutlich abwichen.

Ein weiterer Unterschied bestand in den Wachstumstemperaturen. Der aus Lebensmitteln isolierte Typ I mit weißen, meist schleimigen Kolonien zeigte kräftiges Wachstum in flüssigen Medien schon bei 17°C, der neue Typ hingegen begann erst bei 20°C zu wachsen.

Ob man diese Stämme nur als Typ einordnen soll, oder ob es sich gar um eine andere heterofermentative Art handelt, kann mit den bisher angewandten Abgrenzungsmethoden nicht endgültig entschieden werden. Es müßten dazu die Stoffwechselprodukte untersucht und die serologischen Reaktionen geprüft werden. Es ist aber auf Grund des regelmäßigen Vorkommens dieser Stämme im Mund und Darm und auf Grund ihrer besonderen Merkmale anzunehmen, daß es sich um eine *L.-fermenti*-Standort-Varietät des menschlichen Digestionstraktes handelt.

Zwei weitere Typen, die physiologisch mehr Ähnlichkeit mit Typ I haben, zeichneten sich entweder durch die Vergärung von Trehalose oder mangelndes Angriffsvermögen auf Melibiose und Raffinose aus.

Auch von Rogosa und Mitarb. (1953) war mitgeteilt worden, daß sie bei ihren Mundflora-Untersuchungen Stämme antrafen, die Arabinose und Trehalose vergoren und die in der Vergärung von Melibiose, Raffinose und Laktose versagen konnten.

Bei *L. casei* zeigte sich abweichend von dem bisherigen Bild dieser Art bei den aus dem Darminhalt isolierten Stämmen oft keine Koagulation und Reduktion von Lackmusmilch. Dies deutet darauf hin, daß auch bei dieser Art eine gewisse Anpassung im Digestionstrakt möglichst und weiterhin darauf, daß diese Keime sich doch einige Zeit in diesem vermehrungsfähig halten, denn oral eingenommene typische Keime und aus Stuhlproben nach ein paar Tagen reisolierter zeigten unveränderte Eigenschaften.

Von Rogosa und Mitarb. (1953) wurde eine Variante *L. casei alactosus*

beschrieben, die Laktose nicht anzugreifen vermochte. Die von uns isolierten Stämme griffen in der Bunten Reihe jedoch Laktose immer noch an.

Die von uns gelegentlich ermittelte Vergärung von Raffinose konnte von WHEATER (1955b) und von Rogosa und Mitarb. ebenfalls, aber auch nur vereinzelt, festgestellt werden.

Auch bei *L. plantarum* konnte ein zweiter Typ abgegrenzt werden. Dieser war nicht in der Lage, Arabinose zu vergären. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine andere Art. Die Entscheidung hierüber kann jedoch nur auf Grund eingehender Untersuchungen gefällt werden.

In der Literatur wurde von DAVIS (1955) das Arabinose-Vergärungsvermögen als unterschiedlich angegeben.

Neue Aspekte ergaben sich bei *L. brevis*. Aus höheren Darmabschnitten wurden von uns ausschließlich *L. brevis*-Stämme isoliert, die sich von den meisten aus Lebensmitteln kultivierten durch die kräftige Vergärung von Saccharose unterschieden. Bei einem Vergleich dieser Stämme mit den aus Lebensmitteln isolierten zeigte es sich, daß erstere in S-Form oder zumindest im Anfang ihrer Entwicklung in dieser Form, letztere hingegen häufig in S-R- oder gleich in R-Form auftraten und daß das Vermögen, Saccharose zu vergären, mit der Koloniform in Zusammenhang steht. Gleichzeitig ergibt sich die Folgerung, daß sich die Keime im Digestionstrakt dem Saccharoseangebot angepaßt haben müssen, was wiederum eine längere Verweildauer oder gar Ansiedlung auch dieser Keimart im Darm voraussetzt, denn frisch eingegebene, aus Lebensmitteln kultivierte Stämme konnten, in ihren biochemischen Eigenschaften unverändert, im Laufe einiger Tage reisoliert werden.

Einzelne Stämme, die Laktose vergären konnten, wurden von uns als Typ II eingeordnet.

Eine sichere Abgrenzung der *L. brevis*- von den *L. buchneri*-Stämmen ist durch das unterschiedliche Raffinosevermögen möglich.

Nach Rogosa und Mitarb. (1953) und nach BERGEYS Manual (1957) kann bei *L. brevis* eine Vergärung von Saccharose und gelegentlich auch von Laktose vorkommen. Die Vergärung von Raffinose ist im Bergey ebenfalls als für *L. buchneri* typisch angegeben worden.

Die beiden Arten *L. lactis* und *L. leichmannii* konnten nur ganz vereinzelt in Stuhlproben nachgewiesen werden. Deshalb konnte auch über die Biochemie und die Physiologie dieser Keime wenig Neues ermittelt werden.

Zusammenfassend mag zu diesem Thema gesagt werden, daß, je länger man sich mit der Kultivierung von Laktobazillen-Stämmen befaßt, sich bei den bisher terminologisch festgelegten Arten immer schärfer einzelne Typen herauskristallisieren, die sich in biochemischen, physiologischen und morphologischen Merkmalen unterscheiden.

Die von uns vorgenommene Typeneinteilung war für die praktische Untersuchungsarbeit wichtig, denn nur durch sie waren genauere Zusammenhänge zwischen Nahrungs-, Mund- und Darmflora zu erkennen. Gerade die Zufuhr der Laktobazillen aus der Mundflora in den Dünndarm läßt sich an den verschiedenen Typen des *L. acidophilus* und des *L. fermenti* nachweisen. Inwieweit es erforderlich ist, neue Species abzugrenzen und eine andere Terminologie zu schaffen, wird sich aus notwendigen weiteren Untersuchungen dieser Typen ergeben.

In der Literatur wurde die Umwandlung des *L. acidophilus* in andere Arten erwähnt. Von PEDERSON (1947) wird gefolgert, daß *L. acidophilus*

philus und *L. casei* R- und S-Stämme eines einzigen Typs sind. Von SHARPE und MARRICK (1957) wurde berichtet, daß als *L. acidophilus* deklarierte Stämme, die therapeutisch nach Antibiotikabehandlung verabreicht wurden, sich bei einer genauen Überprüfung durch die Autoren als *L. casei*-Stämme erwiesen.

Auch von uns konnte bei wiederholter Überprüfung eines pharmazeutischen Präparates, das laut Deklaration *L. acidophilus*-Keime enthalten sollte, festgestellt werden, daß es sich bei den lyophilisierten Keimen durchweg um *L. casei*-Keime handelte.

Die Erklärung für unsere Befunde und die der oben genannten Autoren ist sicher darin zu suchen, daß bei der Klassifizierung der Ausgangsstämme diese nicht eingehend genug geprüft wurden, denn *L. casei* unterscheidet sich bei der von uns angewandten biochemischen Differenzierung mit Hilfe von 12 Kohlehydraten von *L. acidophilus* Typ I nur durch die Vergärung von Mannit. Wird nun dieses Kohlehydrat nicht mitüberprüft, so kann man einer Täuschung unterliegen. Physiologisch sind diese beiden Arten dadurch zu unterscheiden, daß *L. casei* immer, *L. acidophilus* jedoch auch nicht nach länger fortgeführten Adaptationsversuchen bei 15°C zu wachsen imstande ist. Außerdem läßt sich *L. casei* aerob viel leichter züchten als *L. acidophilus*, dies besonders auch bei Kultivierungen aus Stuhlproben, so daß bei nicht eingehender Differenzierung von vornherein falsche Stämme für therapeutische Zwecke genommen werden können. Nach unseren Erfahrungen ist es keinesfalls möglich, die verschiedenen Formen der Kolonien zur Unterscheidung von *L. acidophilus* und *L. casei* heranzuziehen, da *L. casei* in der R- und in der S-Form auftreten kann.

Über eine Umwandlung von *L. acidophilus* in Intermediär-Formen, die zwischen *L. acidophilus* und *L. bulgaricus* stehen, berichtete MEHNERT (1960), und zwar waren diese „neuen“ Stämme bei der experimentellen Bereitung von Acidophilus-Milch mit Hilfe des Milchschnitts (*Endomyces lactis*) und des Taette-Streptococcus aus dem fertigen Produkt an Stelle des eingegebenen Stammes reisoliert worden. Sie wurden als „Wuchsform II“ und „Wuchsform I und II“ bezeichnet. Wir überprüften die uns von MEHNERT freundlicherweise überlassenen Stämme, konnten jedoch feststellen, daß es sich weder um *L. acidophilus* noch eine Intermediärform handelt, sondern um heterofermentative Stämme. „Wuchsform II“ entsprach eindeutig unserem *L. fermenti* Typ I und „Wuchsform I und II“ unserem *L. fermenti* Typ IV. Der letztere Typ, der von uns auch einmal aus dem Darm einer Leiche isoliert werden konnte, zeichnete sich auch auf unseren Medien durch dissoziierte Kolonien aus. Die Subkulturen verschiedener Kolonien dissoziierten aber immer wieder und zeigten biochemisch Übereinstimmung, so daß es sich um eine Reinkultur handeln mußte.

Wir sind deshalb nicht geneigt, von einem mutierten *L. acidophilus* zu sprechen, denn eine Umwandlung von einem homo- in einen heterofermentativen Stamm ist nicht anzunehmen. Als Ursache für das augenscheinliche Vorliegen eines solchen Geschehens wurde von uns schon früher (LERCHE und REUTER, 1960) die nicht völlige Reinheit einer Kultur ermittelt. Dieselbe Ansicht hatten auch DAVIS und HAYWARD (1955) geäußert. So könnten bei der von MEHNERT durchgeführten Acidophilus-Milch-Bereitung diese beiden Stämme als Begleitkeime mit in das Ausgangsmaterial verbracht worden sein, möglicherweise mit dem Milchschnitt, denn es wurde mitgeteilt, daß die

„Mutation“ nur eintrat, wenn der Milchschnitt mit verimpft worden war. Da *L. fermenti* in Milch allgemein schneller wachsen kann als *L. acidophilus*, konnte er wahrscheinlich die Oberhand gewinnen und *L. acidophilus* völlig verdrängen!

Auch die von BAUMGÄRTEL (1960 und 1961) an Hand der Literatur und eigener Untersuchungen erwähnte Variabilität des *L. acidophilus* bedarf eingehender Nachprüfungen. Als Hauptkriterium der Umwandlung wurde schlechtes oder mangelndes Maltosevermögen angegeben, dagegen sollen frisch aus den Faeces isolierte Stämme Maltose gut angreifen. Wir konnten bei unseren zahlreichen Isolierungen sowohl bei frisch aus Faeces kultivierten als auch bei älteren Stämmen durchweg ein langsames Vergären der Maltose als der übrigen Zucker feststellen. Auch in der Laktosevergärung gab es keine Veränderung, selbst wenn der Stamm 1 Jahr lang in 2wöchigem Abstand in fl. Briggs-Medium, das als Kohlehydrat Glukose enthält, fortgezüchtet wurde. Aus Milch, die *L. acidophilus* nur bei Zusatz von Hefeautolysat zu koagulieren vermochte, war der verimpfte Keim von uns unverändert wieder zu reisolieren. War das Ausgangsmaterial jedoch nicht völlig keimfrei, so wurde *L. acidophilus* von Streptokokken und anderen grampositiven und gramnegativen Stäbchen verdrängt. Von CARRAZ und MITARB. (1960b) konnte bei genauen und sorgfältigen Untersuchungen über mögliche Veränderungen bei der Herstellung von Acidophilus-Milch unter Zuhilfenahme von *Str. lactis* var. Taette immer wieder aus dem Fertigprodukt *L. acidophilus* unverändert reisoliert werden. Eben solche Ergebnisse brachten auch entsprechende Untersuchungen von WASSERFALL (1960), so daß eine besondere Neigung zur Varianten- oder gar Mutantenbildung bei *L. acidophilus* angezweifelt werden muß.

Schlußfolgerungen

Sowohl in Stuhlproben als auch im Inhalt höherer Darmabschnitte treten physiologisch aerob wachsende Laktobazillen auf, und zwar zahlenmäßig bis zu denselben Größenordnungen wie die *E. coli*-Keime. Dabei kommen neben *L. acidophilus* einige weitere Arten vor.

Die vorgefundenen Laktobazillenarten sind in 3 Gruppen einzuteilen, solche, die regelmäßig in Lebensmitteln, solche, die in Lebensmitteln und in der Mundflora und solche, die nicht in Lebensmitteln, aber in der Mundflora vorkommen.

Zur ersten Gruppe gehören die Arten *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. lactis*, *L. leichmannii* (in der Reihenfolge abnehmender Häufigkeit genannt).

Zur zweiten Gruppe gehört der häufige *L. fermenti* mit seinen verschiedenen Typen.

Zur dritten Gruppe gehören der häufige *L. acidophilus* mit verschiedenen Typen und *L. salivarius*.

Alle genannten Arten vermögen die Magenpassage zu überstehen, und sie vermehren sich mit Ausnahme von *L. leichmannii* und *L. lactis*, für die es nicht eindeutig bewiesen wurde, im Darm. Folglich besteht eine dauernde Beeinflussung der aeroben Laktobazillenflora des Darmes durch den Laktobazillengehalt der Nahrung und der Mundhöhle.

Der Dünndarm enthält in seinen oberen und mittleren Abschnitten nach

länger unterbrochener Nahrungszufuhr nur wenig oder gar keine Laktobazillen und andere Keime. Also besteht eine gewisse Autosterilisation. Das gehäufte Auftreten von Laktobazillen ist an das Vorliegen von Chymus gebunden. Das untere Ileum zeigt eine konstantere Laktobazillenflora, die einen Übergang zu der entsprechenden Flora des Caecums darstellt, in der *L. acidophilus* und *L. fermenti* überwiegen.

Im Verlauf der normalen Colonspassage sterben im Gegensatz zu den aus Lebensmitteln zugeführten Laktobazillenarten die in höheren Darmabschnitten und in der Mundhöhle regelmäßig anzutreffenden Arten *L. acidophilus* und *L. salivarius* weitgehend ab. Bei beschleunigter Peristaltik sind sie dagegen zahlreich in Stuhlproben nachzuweisen.

Die aus Lebensmitteln stammenden Arten sind nur einige Tage nach oraler Einnahme in Stuhlproben nachzuweisen. Es besteht jedoch auf Grund biochemischer Besonderheiten einiger aus höheren Darmabschnitten isolierter Stämme Anlaß zu der Annahme, daß sich besondere Typen dieser Keime auch länger im Darm halten können.

Die pH-Werte sind im oberen Jejunum ziemlich konstant und liegen bei 6,2. Nach dem Caecum hin divergieren sie zunehmend. Der Durchschnittswert beträgt im Ileum etwa 6,4. Im Dickdarm nimmt die Divergenz entweder nach der alkalischen oder nach der sauren Seite hin zu.

Post mortem-Untersuchungen von Darminhalt sind, aber nur bei entsprechender Auswahl der Fälle, geeignet, Aufschluß über physiologische intestinale Keimverhältnisse zu geben.

In der Mundhöhle und im Darm zeigen sich bestimmte biochemische Typen der einzelnen Laktobazillenarten. Ihre genaue Abgrenzung ermöglicht Aussagen über die Zusammenhänge zwischen Nahrungs-, Mund- und Darmflora.

Die aerob wachsenden Laktobazillen des Darmes, bisher in der Literatur meist unter „*Acidophilus*-Gruppe“ zusammengefaßt, sind eindeutig von den obligat anaeroben Laktobazillen, der *L. bifidus*-Gruppe, zu trennen.

Zusammenfassung

In 35 von 57 Stuhlproben, die bei 21 Personen stichprobenweise entnommen wurden und in 149 von 176 Stuhlproben, die bei 8 Versuchspersonen während gezielter Nachweisversuche entnommen wurden und im Inhalt höherer Darmabschnitte von 16 von insgesamt 30 untersuchten Verstorbenen konnten aerob wachsende Laktobazillen nachgewiesen werden. Die Zahl der Laktobazillen konnte bis an die *E. coli*-Zahl heranreichen. Diese *L.* wurden differenziert. Neben *L. acidophilus* konnten *L. fermenti*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. lactis* und *L. leichmannii* ermittelt werden, wobei die Arten in der Reihenfolge abnehmender Häufigkeit genannt sind.

Das Überstehen der Magenpassage und eine Vermehrungsfähigkeit im Darm wurde an den Arten *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermenti*, *L. buchneri* und *L. brevis* experimentell durch orale Einnahme und Reisolierung aus den Faeces und für *L. salivarius* und *L. acidophilus* durch Untersuchung der Mundhöhle und des Dünndarminhaltes ermittelt. Somit konnte eine Beeinflussung der aeroben Laktobazillenflora des Darmes durch den Laktobazillengehalt der Nahrung und der Mundhöhle nachgewiesen werden. Außerdem konnten weitere Einzelheiten über das Verhalten der aeroben Laktobazillen, insbesondere des *L. acidophilus*, im menschlichen Darmkanal ermittelt werden.

Einzelne Laktobazillenarten konnten in ihrem morphologischen, physiologischen und biochemischen Verhalten genauer definiert und typisiert werden. Insbesondere war dies möglich bei *L. acidophilus*, *L. fermenti* und *L. brevis*.

Summary

The Presence of aerobic gram-positive rods of the genus *Lactobacillus* Beijerinck in the Bowel Content of Adults
M. Lerche and G. Reuter

In 35 of 57 stool samples obtained at random in 21 persons, and in 149 of 176 stool samples from 8 test persons during specific trials for demonstration, and in the contents of proximal-segments of the bowels of 16 of a total of 30 autopsy cases studied aerobic lactobacilli could be demonstrated. The number of lactobacilli reached eventually that of *E. coli*. These lactobacilli were differentiated. Besides *L. acidophilus*, *L. fermenti*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. lactis* and *L. leichmannii* could be found, the types mentioned in the order of decreasing frequency.

The survival of bowel passage and capability to grow in the bowels were demonstrated experimentally with the types *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermenti*, *L. buchneri* and *L. brevis* by oral intake and re-isolation from the feces, and for *L. salivarius* and *L. acidophilus* by examination of the oral cavity and the contents of the small bowels. Thus, an influence of the lactobacillus content of the food and the oral cavity on the aerobic lactobacillusflora of the bowel could be demonstrated. Besides, further details about the behaviour of aerobic lactobacilli, particularly *L. acidophilus*, in the human bowel canal could be found out.

Single types of lactobacilli could be defined more closely and characterized in their morphological, physiological and biochemical behaviour. This was possible particularly for *L. acidophilus*, *L. fermenti* and *L. brevis*.

Résumé

La présence de bâtonnets gram-positifs à évolution aérobie du genre *Lactobacillus* Beijerinck dans le contenu intestinal d'humains adultes

M. Lerche et G. Reuter

- Dans 35 des 57 prélèvements de selles faits «au hasard» chez 21 personnes,
 - dans 149 des 176 prélèvements de selles faites chez 8 sujets s'étant prêtés bénévolement à la recherche systématique,
 - et dans 16 des 30 échantillons prélevés au cours de 30 autopsies,
- les auteurs ont pu démontrer la présence de lactobacilles ayant évolué en milieu aérobie.

Leur nombre était susceptible d'atteindre jusqu'à l'équivalent de celui d'*E. coli*. Les Lactobacilles trouvés furent ensuite repartis par espèces. En plus de *L. acidophilus* furent identifiés ainsi: *L. fermenti*, *salivarius*, *casei*, *plantarum*, *brevis*, *buchneri*, *lactis* et *leichmannii* (cités par importance dégressive de fréquence).

La capacité de résister pendant le passage par la bouche et de se reproduire ensuite dans l'intestin fut confirmée pour *L. casei*, *plantarum*, *fermentum*, *buchneri* et *brevis* par l'épreuve de l'administration per os et isolement consécutif dans les fèces, — elle le fut pour *L. salivarius* et *acidophilus* par des examens d'abord de la cavité buccale et ensuite du contenu de l'intestin grêle.

Il est ainsi prouvé que la flore aérobie de lactobacilles de l'intestin est influencée par la quantité de lactobacilles des aliments et de la cavité buccale.

Les auteurs purent déceler d'autres particularités du comportement des lactobacilles aérobie, en particulier de *L. acidophilus*, dans le tractus intestinal humain.

Ils réussirent enfin à définir et à préciser le type de plusieurs espèces de Lactobacilles, en particulier d'*acidophilus*, *fermentum* et *brevis*, par leur comportement morphologique, physiologique et biochimique.

Resumen

La aparición de bacilos Gram-positivos de crecimiento aerobio del género *Lactobacillus* Beijerinck en el contenido intestinal de hombres adultos

M. Lerche y G. Reuter

- Se pudieron demostrar lactobacilos aerobios en 35 de 57 pruebas de heces, tomadas al azar en 21 personas, y en 149 de 176 pruebas de heces, tomadas de 8 personas en el

Algunos tipos de lactobacilos se pudieron definir y tipizar de una manera más precisa en su morfología, y en su comportamiento fisiológico y bioquímico. Esto fue posible especialmente en el *L. acidophilus*, *L. fermenti* y *L. brevis*.

Заключение

Выносливость желудочно-кишечного пассажа и способность размножения в кишечнике была установлена экспериментально у видов *J. l. casei*, *J. l. plantarum*, *J. l. fermenti*, *J. l. busnbergi* и *J. l. brevis* путем приема через рот и реинфицирования из выделений для *J. l. salivarius*, и *J. l. acidophilus* путем исследования ротовой полости и содержания жимного тонких кишок. Таким образом можно было доказать влияние содержания лактобацилл пищи и ротовой полости на аэробную флору лактобацилл в кишечнике. Кроме того можно было установить дальнейшие подробности в поведении аэробных лактобацилл, особенно *J. l. acidophilus* в кишечнике человека. Отдельные виды лактобацилл можно было точнее определить и типизировать в их морфологическом, физиологическом и биохимическом поведении. Особенно это было возможно у *J. l. acidophilus*, *J. l. fermenti* и *J. l. brevis*.

BAUNGÄRTEL, T.: *Milchwiss.* **15**, 496 (1960).

BERG'S Manual of Determinative Bacteriology, The Williams & Wilkins Comp., Baltimore, 1956, 4th ed. (1961).
more, 7. Edition (1957).
BOGENDÖRFER, L.: Dtsch. Arch. klin. Med. **140**, 257 (1922).
- Dtsch. med. Wschr. **50**, 1085 (1924).
BOGENDÖRFER, L. and BUCHHOLZ: Dtsch. Arch. klin. Med. **142**, 318 (1923).
BRIGGS, M.: J. Dairy Research, **20**, 36 (1953a).
- J. Gen. Microbiol., **9**, 234 (1953b).
CARRAZ, M. and MOULIN, A.: C. R. Soc. Biol. **152**, 1505 (1958a); Ref. Zbl. f. Bakt. I Ref. **173**, 292 (1959).
- C. R. Soc. Biol. **152**, 1520 (1958b); Ref. Zbl. f. Bakt. I Ref. **173**, 292 (1959).

Prof. Dr. Dr. h.c. M. Lerche und Dr. G. Reuter, Berlin-Dahlem, Bitterstr. 8-12

Debrogosz

FOOD BIOPRESERVATIVES *of* MICROBIAL ORIGIN

- Bibek Ray, Ph.D.

Professor
Department of Animal Science
University of Wyoming
Laramie, Wyoming

Mark Daeschel, Ph.D.

Associate Professor
Department of Food Science
and Technology
Oregon State University
Corvallis, Oregon



CRC Press

Boca Raton Ann Arbor London Tokyo

TABLE OF CONTENTS

Chapter 1	
The Need for Food Biopreservation	1
Bibek Ray	

Chapter 2	
Foods and Microorganisms of Concern	25
Bibek Ray	

Chapter 3	
Procedures to Detect Antimicrobial	
Activities of Microorganisms	57
Mark A. Daeschel	

Chapter 4	
Cells of Lactic Acid Bacteria	
as Food Biopreservatives	81
Bibek Ray	

Chapter 5	
Acetic, Propionic, and Lactic Acids of	
Starter Culture Bacteria as Biopreservatives	103
Bibek Ray and William E. Sandine	

Chapter 6	
Diacetyl of Lactic Acid Bacteria	
as a Food Biopreservative	137
Bibek Ray	

Chapter 7	
Hydrogen Peroxide, Lactoperoxidase	
Systems, and Reuterin	155
Mark A. Daeschel and Michael H. Penner	

Chapter 8	
Bacteriocins of Starter Culture Bacteria	
as Food Biopreservatives: An Overview	177
Bibek Ray	

Chapter 9	
Nisin of <i>Lactococcus Lactis</i> ssp. <i>Lactis</i>	
as a Food Biopreservative	207
Bibek Ray	

Chapter 10	
Pediocin(s) of <i>Pediococcus acidilactici</i>	
as a Food Biopreservative	265
Bibek Ray	

Chapter 11	
Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria	323
Mark A. Daeschel	

Chapter 12	
Metabolites of Yeasts as Biopreservatives	347
Alan T. Bakalinsky	

HYDROGEN PEROXIDE, LACTOPEROXIDASE SYSTEMS, AND REUTERIN

Mark A. Daeschel and Michael H. Penner

TABLE OF CONTENTS

I.	Introduction	156
II.	Hydrogen Peroxide	156
	A. Properties	156
	B. Hydrogen Peroxide and Starter Culture Bacteria	157
III.	Lactoperoxidase Systems	162
IV.	<i>Lactobacillus reuterii</i> and Reuterin	167
V.	Concluding Remarks	171
	References	173

I. INTRODUCTION

Microorganisms are in constant competition with each other for nutrients and favorable environments. Mechanisms have evolved through mutation and exchange of genetic material that allow microorganisms to successfully grow and reproduce in changing environments. The diversity of the microbial world is proof of how change ensures survival. Apparent overt antagonism by production of molecules such as bacteriocins or environment modification by acid production are two examples of adaptation. Undoubtedly, microorganisms secrete compounds that influence the populations of microbial communities in ways scientists cannot discern. Many antagonistic products secreted are simply by products of detoxification processes of the producer microorganism, an example being hydrogen peroxide. Other metabolites secreted are in themselves very inhibitory, but seldom accumulate to concentrations that display discernable antagonistic effects, examples being higher alcohols and fatty acids. Carbon dioxide is a primary metabolite that we don't usually associate with antagonism, however, storage of fruits, vegetables, and beverages in a carbon dioxide environment is very effective in controlling the growth of spoilage microorganisms. In fact, it is likely that any microbial metabolite at a certain concentration will be antagonistic to other microorganisms. Applications in food protection mandate that antimicrobials be effective at low concentrations and not significantly impact the identity of the product. These requirements limit the number of microbial metabolites that may have application in food science. In this chapter we will discuss potential and realized food preservation applications of (1) hydrogen peroxide, as it relates to its production by lactic starters, (2) the lactoperoxidase system, and (3) reuterin, an inhibitory metabolite produced by *Lactobacillus reuterii*.

II. HYDROGEN PEROXIDE

A. Properties

Hydrogen peroxide (H_2O_2 , molecular weight 34.02) is a colorless liquid; it has a density of 1.46 at $0^\circ C$, a boiling point of $152^\circ C$, and is miscible with water and insoluble in petroleum ether.¹ Hydrogen peroxide is a strong oxidizing agent and has several applications in the food industry, including use as a bleaching agent, a starch-modifying agent, a preservative, and an antimicrobial agent. The Food and Drug Administration² permits its use as a GRAS substance in milk (0.05%), whey (0.04%), starch (0.15%), and corn syrup (0.15%). The Bureau of Alcohol, Tobacco and Firearms allows a limit of 3 ppm in wine processing, however the final product must not contain a detectable residue¹. The antimicrobial activity of hydrogen peroxide increases dramatically with rises in temperature. Because of this property, hydrogen peroxide has been used as a sterilant for container materials in aseptic packaging systems. Hydrogen peroxide is considered an effective sterilant in aseptic systems at concentrations of 30% if heated to 85 to $90^\circ C$ for 3 to 5 sec.³ With a view toward food

applications, hydrogen peroxide has the desirable property of having innocuous degradation products ($\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) and being active at relatively low concentrations, with 25 ppm or less needed to prevent growth of vegetative bacteria.⁴ Residual hydrogen peroxide can be removed by the addition of catalase to foods (e.g., 0.1–0.5g/1000 lb milk⁵), or in aseptic packaging it is blown off with hot sterile air. Hydrogen peroxide reacts with organic materials which may limit its usefulness in certain foods. Food components such as ascorbic acid, cysteine, and glutathione have intentionally been considered for use in degrading residual hydrogen peroxide in raw milk⁶. Hydrogen peroxide may impart undesirable characteristics to food such as oxidized flavors, bleaching, and degradation of nutrients.⁷

Hydrogen peroxide is an effective antimicrobial by virtue of its oxidizing potential. Block⁴ discussed and summarized the mechanism of action of hydrogen peroxide as the generation of a toxic specie (the hydroxy radical) by reaction of hydrogen peroxide with superoxide ion, the latter formed by reduction of molecular oxygen. The hydroxy radical, being very reactive, will immediately react and damage essential cellular components such as membrane lipids and DNA.

Many fermentative bacteria, including the lactic acid bacteria, produce hydrogen peroxide as a mechanism for protecting themselves against oxygen toxicity. Hydrogen peroxide can be generated by a variety of mechanisms, including nonenzymatic superoxide reduction, and oxidase and dehydrogenase-mediated reactions (reviewed by Fleming et al.⁸). Hydrogen peroxide-generating cells protect themselves from hydrogen peroxide either by enzymatically degrading it with catalase, NADH peroxidase, a manganese pseudocatalase, or by secretion and dilution into the bulk environment to nontoxic levels.

B. Hydrogen Peroxide and Starter Culture Bacteria

Shortly after the initial characterizations of nisin⁹ and diplococcin¹⁰ in 1944, a report¹¹ appeared on an antibiotic-like substance produced by a strain of *Lactobacillus lactis* isolated from Gruyere cheese. The substance, designated lactobacillin, was later concluded¹² to likely be hydrogen peroxide, although its physical presence was not documented. This report was the first observation that certain antagonistic activities by lactic acid bacteria could be due to hydrogen peroxide. Undoubtedly, during the earlier investigations of antagonistic activity of lactic acid bacteria, there were some uncertainties and misinterpretations as to the identities of the inhibitory substances produced by lactobacilli. In retrospect, after reviewing the literature, it appears that some of the uncertainties may stem from the probability that the observed antagonism was the result of several substances (i.e., bacteriocins, acids, and H_2O_2) which were not evaluated individually.

The observation of hydrogen peroxide production and accumulation was most often associated with the lactobacilli in contrast to the other lactic genera. Dahiya and Speck¹³ investigated the inhibitory activity in culture filtrates of

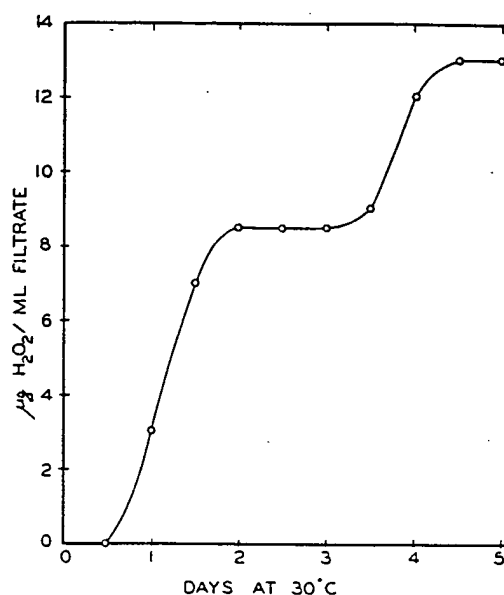


FIGURE 1. Accumulation of H_2O_2 in 1% peptone broth during growth of *Lactobacillus* L-3 at 30°C. (From Price, R. J. and Lee, J. S., *J. Milk Food Technol.*, 33, 13, 1970. With permission.)

Lactobacillus lactis and *Lactobacillus bulgaricus* that were antagonistic to *Staphylococcus aureus*. The antagonism was demonstrated to be due to hydrogen peroxide by the dissipation of inhibitory activity when catalase was added to filtrates, and by direct measurement of hydrogen peroxide produced. Moreover, hydrogen peroxide concentration was maximal (12.5 mg/ml) when producer cells were held in glucose (0.25%) containing buffer at pH 7.0 for 15 d at 5°C. Under their experimental conditions it was reported that 6 mg/ml was bacteriostatic and 20–22 μg/ml was bacteriocidal for *S. aureus*.

Price and Lee¹⁴ identified strains of *Lactobacillus plantarum*, isolated from seafood, that were antagonistic to *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Proteus* species. The antagonistic component in *L. plantarum* culture filtrates was dialyzable, inactivated by heat, and completely inactivated when exposed to catalase (300 IU/ml). Furthermore, hydrogen peroxide concentrations were measured and found to reach levels of about 8 to 9 μg/ml after 2 d incubation at 30°C in 1% peptone broth (Figure 1). Moreover, between 2 to 4 d there was no increase in hydrogen peroxide levels, but at 5 d a concentration of 13 mg/ml was recorded that slowly decreased to 10 to 12 μg/ml after 10 d incubation. The inhibitory activity of the culture filtrates paralleled measured hydrogen peroxide, providing additional proof that *L. plantarum* produced hydrogen peroxide at levels inhibitory to certain bacteria. It was noted that *Pseudomonas* species were the most sensitive to the hydrogen peroxide containing *L. plantarum* culture filtrates. In addition, the minimum bacteriostatic concentrations for *Pseudomonas* species were determined to be from 2 to 8 mg/ml, which had

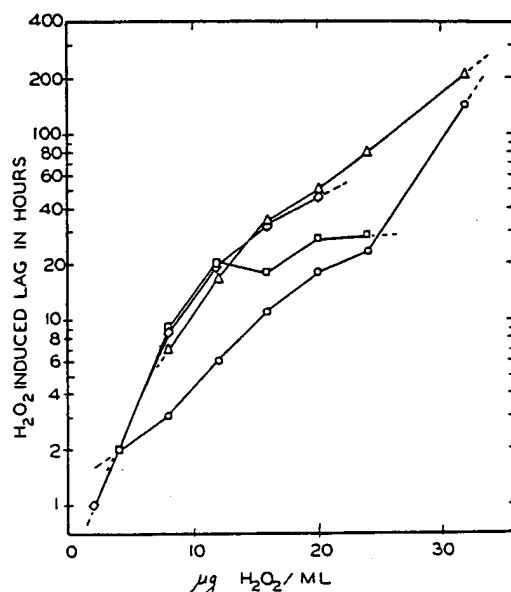


FIGURE 2. Inhibitory effect of hydrogen peroxide on *Pseudomonas* in 1% peptone broth at 30°C. Symbols: O, *Pseudomonas* PI-406; ◊, *Pseudomonas* PII-320; ◻, *Pseudomonas* PIII-332; Δ, *Pseudomonas* PIII-985. (From Price, R. J. and Lee, J. S., *J. Milk Food Technol.*, 33, 13, 1970. With permission.)

the effect of increasing the bacterial growth lag time from 1 to 7 h. At hydrogen peroxide concentrations of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ the lag times were in excess of 200 h (Figure 2) and were predicted to become infinite at higher concentrations. The applied significance of these observations was discussed; the authors concluded that lactobacilli, by virtue of their inhibitory properties, may be beneficial in food products by preventing the growth of spoilage microorganisms such as *Pseudomonas*.

The aforementioned study, and that of Dahiya and Speck, clearly demonstrated that lactobacilli under defined conditions are bacteriostatic, though not necessarily bacteriocidal, to certain microorganisms that contaminate foods. Collins and Aramiki¹⁵ evaluated the ability of 4 strains of *L. acidophilus* to produce hydrogen peroxide under different environments. They observed that one of the strains (C) when held at 37°C in reconstituted skim milk (10%) and continuously shaken, produced in excess of 40 mg/ml at 12 h of incubation (Figure 3), but less than 5 mg/ml when held under static conditions. The same strains were further evaluated for their inhibitory effect against *Pseudomonas fragii* when inoculated into milk (4°C) containing the *Pseudomonas* bacteria. The authors' data indicated that a growth-retarding effect on *P. fragii* was evident (Figure 4) with some strains of *L. acidophilus*, however they also presented evidence that *P. fragii* could degrade a portion of the hydrogen peroxide produced.

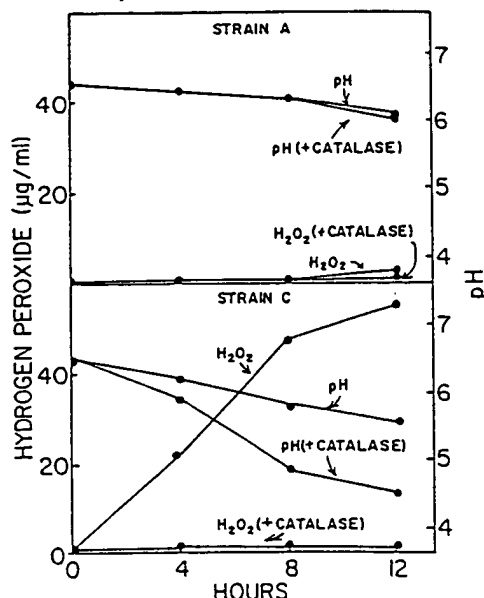


FIGURE 3. Production of hydrogen peroxide by two strains of *Lactobacillus acidophilus* continuously shaken at 37°C with and without the addition of catalase (42 µg/ml). (From Collins, E. B. and Aramak, K., J., *Dairy Sci.*, 63, 353, 1980. With permission.)

Sweet acidophilus milk is a product in which viable *L. acidophilus* strains are added ($>1 \times 10^6$ cfu/ml) to milk that is held under refrigeration conditions until consumed. The aforementioned results of Collins and Aramiki¹⁵ led them to conclude that "Our results indicate that an impractically large number of *L. acidophilus* would be required for the accumulation of enough hydrogen peroxide to be a factor in extending the shelf life of such products" (i.e., Sweet acidophilus milk). Gilliland and Speck¹⁶ observed antagonistic activities by *L. acidophilus* strains when grown in associative cultures with the foodborne pathogens, *S. aureus* and *Salmonella typhimurium*, and with enteropathogenic *Escherichia coli*. To eliminate pH lowering of the culture medium by *L. acidophilus* as a source of inhibition, automatic pH controllers were employed. The authors concluded that acid production and pH changes were not sufficient to explain the observed inhibition of the pathogens. The inclusion of catalase into the associative cultures did reduce the antagonistic activities of *L. acidophilus*, but still greater than 50% of the antagonistic activity remained. They summarized their study with the statement that "The antibacterial action produced by *L. acidophilus* is probably due to a combination of factors including acid, hydrogen peroxide and other inhibitory factors including the antibiotics previously reported" (referring to Hamdan and Mikolajick,¹⁷ Vakil and Shahani,¹⁸ and Vincent et al.¹⁹).

The formation of hydrogen peroxide by the dairy lactococci has been studied,^{20,21} and with some strains,²⁰ the concentration observed to accumulate

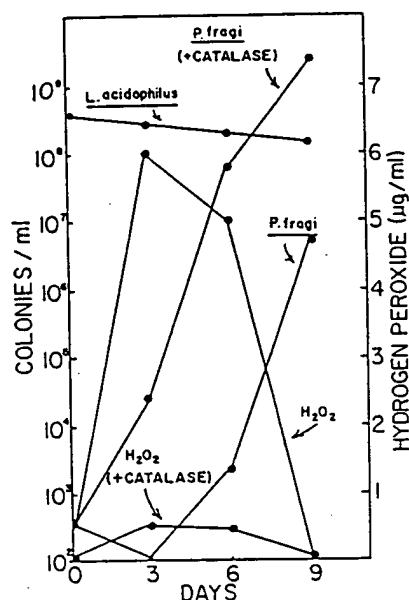


FIGURE 4. Influence of *Lactobacillus acidophilus* (strain C) on the growth of *Pseudomonas fragi* continuously shaken at 4°C with and without the addition of catalase (42 µg/ml). (From Collins, E. B. and Aramak, K., J., *Dairy Sci.*, 63, 353, 1980. With permission.)

was inhibitory to the producer strain. It appears, however, that the lactococci do not accumulate hydrogen peroxide, in concentrations observed with the lactobacilli, perhaps reflecting a greater sensitivity to hydrogen peroxide, or more efficient enzymatic degradation systems.²² A recent investigation²³ indicated that hydrogen peroxide production in *Lactobacillus leichmanii* could be induced by saturated fatty acids, i.e., palmitic acid, with subsequent accumulations of up to 7 mM (238 mg/ml). The amounts of hydrogen peroxide produced by dairy lactococci have been reported²⁴ to be quite small (<.70 mg/ml) with strains of *L. lactis* subsp. *diacetylactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* after growth at 25 to 30°C under static conditions in milk. Likewise, the same small amounts of hydrogen peroxide were observed to be produced by *Leuconostoc dextranicum*. Similarly, hydrogen peroxide production and accumulation with *Pediococcus cerevisiae*,²⁵ a meat starter culture, was very low (<1 mg/ml).

The roles of starter culture bacteria in food preservation in regard to hydrogen peroxide production have been reviewed by Babel²⁶ and Gilliland.²⁷ Both reviews described several approaches for using antagonistic starters in dairy products and other foods. Preservation strategies that may be considered are (1) addition of viable starter cells to foods where they can synthesize and secrete antagonistic components, (2) addition of spent microbial media containing antagonistic metabolites to foods, and (3) addition of purified antagonistic metabolites, i.e., nisin and hydrogen peroxide, etc. directly to

foods. Accordingly, the efficacy of the first two approaches depends on consistent strain performance, either in the food or in the medium to be added to the food. Furthermore, the antagonistic metabolites, all other metabolites, and the medium used would need to be compatible with the chemical and sensory identity standards of the food product. Some of these constraints also apply when using purified microbial metabolites.

The addition of dairy lactococci to refrigerated milk (3.5 and 7°C.) to inhibit psychrotrophic bacteria was investigated by Juffs and Babel.²⁸ They observed that mixed cultures were more inhibitory than pure cultures of either *L. lactis* subsp. *diaceylactis* or *L. lactis* subsp. *cremoris*, in suppressing psychrotrophs. The observed inhibition effect in the milk was concluded to be bacteriostatic rather than bacteriocidal. Furthermore, at least a portion of the inhibitory activity could be ascribed to hydrogen peroxide. Moreover, inhibition was also apparent in the absence of any significant acid production. Gilliland and Speck²⁹ used cultures of lactobacilli and pediococci to inhibit psychrotrophic bacteria in nonfermented refrigerated foods. They observed with ground beef held at 5°C having an initial psychrotroph count of 6.7×10^2 cfu/ml, that *L. bulgaricus* and *L. lactis*, when added, allowed the psychrotrophs to increase by only one log cycle in 3 d. In contrast, the control sample without lactic culture added permitted the psychrotrophs to increase almost three log cycles. Similarly, *Pediococcus cerevisiae* was also able to retard psychrotroph growth, but not to the same extent as the lactobacilli. In conclusion, these investigators suggested that the major inhibitory effect of the lactobacilli used in their study was likely from hydrogen peroxide production. Another investigation³⁰ on the inhibitory effects of *L. bulgaricus* on psychrotrophs, this time in sterile refrigerated milk (5°C), showed an average inhibitory effect of 26 to 82% as compared to the control after storage for 6 d.

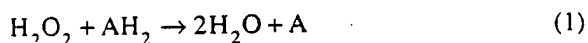
III. LACTOPEROXIDASE SYSTEMS

Peroxidase systems have been known to have antimicrobial properties since the early 1940s when Agner³¹ demonstrated the antimicrobial activity of a peroxidase preparation derived from leukocytes. It was later demonstrated, by Wright and Tramer,³² that the peroxidase system of bovine milk had a similar inhibitory effect on certain classes of bacteria. The peroxidase system of bovine milk had been previously purified by Theorell and Åkesson³³ and given the name lactoperoxidase. Immunochemical techniques were subsequently used to show the presence of lactoperoxidase in bovine saliva.³⁴ Further studies have demonstrated LP activity in the saliva of different animals and selected human secretions.³⁵

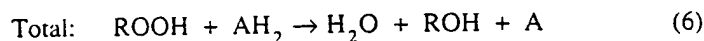
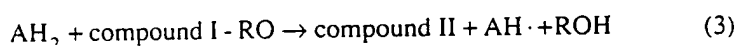
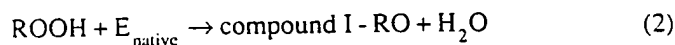
The lactoperoxidase system (LPS) is one of several nonspecific antimicrobial systems present in bovine milk.³⁶ The active LPS includes three primary components: the lactoperoxidase enzyme, thiocyanate (SCN^-), and hydrogen peroxide (H_2O_2). The LPS is antimicrobial due to the production of toxic, short-lived, oxidation products when lactoperoxidase catalyzes the oxidation of thiocyanate by hydrogen peroxide.

Lactoperoxidase is a heme containing glycoprotein with a molecular weight of approximately 78,000.³⁷ Fractionation studies using conventional chromatography followed by electrophoretic analyses have identified at least 10 fractions of LP in bovine milk. The different fractions are at least partially due to differences in the carbohydrate moieties of the enzyme. Some of the forms may be an artifact of the purification protocol and, hence, the significance of this heterogeneity in vivo is not clear.

The classical peroxidase catalyzed reaction involves hydrogen peroxide as a hydrogen/electron acceptor, and another compound, designated AH₂, as the hydrogen/electron donor.



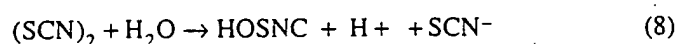
The general mechanistic scheme for the above redox reaction (1), is as follows.³⁸



Note that equations (1) and (6) are equivalent when letting R = H, which is the case when hydrogen peroxide serves as the peroxide-oxidizing agent. The native resting enzyme, E_{native}, is the peroxidase hemoprotein with its iron in the formal oxidation state of FeIII. In reaction (2) the peroxide is split in a two-electron oxidation of the enzyme complex to form water and a complex including compound I and -RO. The formal oxidation state of iron in compound I is FeV. Compound I is then reduced by a single electron donation from AH₂ to compound II, with the subsequent release of ROH. The iron of compound II has a formal oxidation state of FeIV. A second single electron transfer then completes the cycle by reducing the enzyme to its resting FEIII state.

The single electron donors likely to participate in the above reaction scheme, AH₂, are compounds which give stable radicals such as phenols and ascorbate. However, the primary compound undergoing oxidation in the LPS is thiocyanate, which is not believed to be oxidized by sequential one-electron transfers, but rather by a single two-electron transfer process.³⁹ Evidence supporting this contention is that no compound II can be detected in defined LPS reaction

mixtures, and when compound II is produced by other means it reacts very slowly with SCN^- .³⁹ Therefore, it has been postulated that compound I directly oxidizes SCN^- by a 2 electron process similar to that observed for the peroxidase-catalyzed oxidation of halides. The initial product(s) of the enzymatically catalyzed oxidation of SCN^- has not been conclusively determined. It has been established that the principle product to build up in active aqueous LPS systems is hypothiocyanite (OSCN^-),^{40,41} which is in acid-base equilibrium with hypothiocyanous acid (HOSCN), pK_a of approximately 5.3.⁴² Proposed mechanisms for the production of hypothiocyanite/hypothiocyanous acid include the following.⁴¹



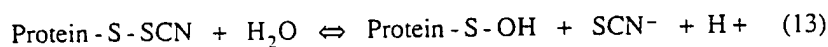
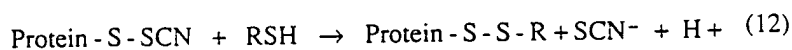
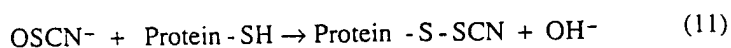
or



The differences in the postulated mechanisms for peroxidase reactions with thiocyanate and "AH₂"-type compounds provide a rationale for the limiting antimicrobial activity of the LPS at low SCN^- concentrations. The limiting activity would be the result of compound I preferentially reacting with AH₂-type compounds at low SCN^- concentrations, to yield compound II. This is in contrast to compound I directly oxidizing available SCN^- . This results in a build up of compound II due to the relatively slow step of reducing compound II to E_{native} . As mentioned above, compound II does not react at an appreciable rate with SCN^- . Hence, there may be a competition between substrates in which the oxidation of SCN^- leads to toxic products, while the oxidation of AH₂ does not. Oxidation products other than hypothiocyanite have been detected, in lesser amounts, in active LPS preparations.⁴¹ It was suggested that these trace products may be higher oxy acids of SCN^- . The significance of these products in vivo has yet to be determined.

The mechanisms through which the LPS exerts its antimicrobial properties have not been conclusively determined.⁴³ The primary products of the LPS, hypothiocyanite (OSCN^-) and thiocyanogen ($(\text{SCN})_2$) have been shown to oxidize protein sulfhydryls to sulfenyl thiocyanates ($-\text{S}-\text{SCN}$), disulfides ($-\text{S}-\text{S}-$) and sulfenic acids ($-\text{S}-\text{OH}$).⁴³ It is conceivable that these oxidations may result in the deactivation of key metabolic enzymes or structural proteins⁴⁴ resulting in the death or inhibition of the target microorganism. The proposed reaction schemes for sulfhydryl oxidation (below) are consistent with the experimentally observed proportionality between sulfhydryl oxidation and H_2O_2 concentra-

tion, and the apparent independence of sulfhydryl oxidation with respect to thiocyanate concentrations, under certain conditions.⁴⁴



The proposed "turnover" of SCN^- as depicted above may account for its apparent ability to participate in more than one oxidative cycle. Under these conditions, it may be rationalized that the total moles of oxidized sulfhydryl derivatives will be proportional to the H_2O_2 concentration, not thiocyanate. The reversal of LPS microbial inhibition by thiol supplementation supports the suggestion that sulfhydryl oxidation is an important factor in the antimicrobial mechanism.⁴⁵ In vitro studies coincubating proteins and amino acids with the active LPS have demonstrated the potential for modification of aromatic amino acids.⁴⁶ They also observed that hypothiocyanous acid does not readily react with these amino acids, suggesting the formation of more reactive, possibly transient, intermediate oxidation products in the active LPS system. Further evidence for the production of products more toxic than hypothiocyanite in the LPS have come from studies comparing the toxicity of the active LPS in the presence of target microorganisms, versus the LPS products produced separately and then coincubated with the microbial population. In these experiments, exposure of the microorganisms to the active LPS was found to be more inhibitory than exposure to seemingly similar products produced separately.^{45,47}

In recent years there has been increasing interest in the practical aspects of using the bovine LPS as a milk preservative. To be utilized in this capacity it is clear that all three of the components of the LPS must be present before its antimicrobial properties are manifested. The concentration of the lactoperoxidase enzyme in raw milk is sufficient for bactericidal activity. In fact, lactoperoxidase is the most abundant enzyme in bovine milk.⁴⁸ The concentration of thiocyanate in milk is variable depending on the cow's diet, but levels between 1 and 10 ppm are typical.⁴⁹ This level is a little below that suggested for maximum activity of the LPS, and hence the addition of small amounts (~8 ppm) of thiocyanate may be appropriate. However, milk normally contains sufficient thiocyanate to activate the LPS.⁵⁰ It should be noted that the concentration of thiocyanate in human gastric juices (~23 ppm) is greater than that which would be found in milk even after any possible supplementation of milk.⁴⁹ In contrast to the other two components, the concentration of hydrogen peroxide in bovine milk is assumed to be negligible. Consequently, a source of hydrogen peroxide must be added to the milk to activate the LPS. Only relatively small amounts of hydrogen peroxide (~8 ppm) need to be added for the activation of LPS. This is in contrast to "traditional" methods of

hydrogen peroxide preservation which require the addition of up to 800 ppm hydrogen peroxide.

Hydrogen peroxide can be supplied to milk in three main ways: (1) by direct addition of hydrogen peroxide, (2) by the addition of an isolated enzyme system which generates hydrogen peroxide (such as glucose/glucose oxidase), or (3) by inoculation with microorganisms that generate hydrogen peroxide. It appears that the most feasible method of supplying hydrogen peroxide for large scale dairy applications is to inoculate the milk with a safe, hydrogen peroxide-generating bacteria. One precedent for this methodology is the incorporation into raw bovine milk of Raw Milk Inoculum (RMI) currently marketed by Chr. Hansen's Laboratory, Milwaukee, WI (R. Sellars, personal communication).

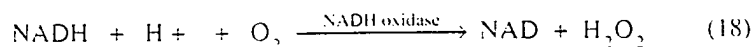
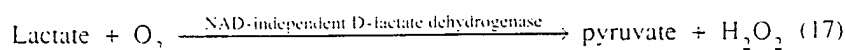
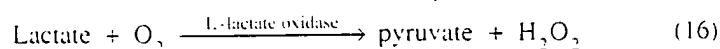
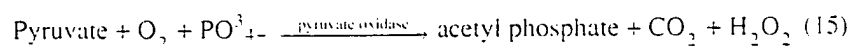
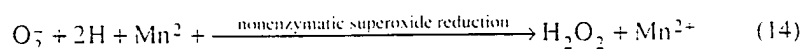
The lactoperoxidase enzyme of bovine milk is somewhat resistant to heat inactivation. This has led to the speculation that the LPS system may be utilized for milk preservation following pasteurization. The rate of heat inactivation of LP is strongly influenced by the composition of the milk.³⁷ In whole milk, ~75% of the LP activity is lost after 15 s at 70°C. In contrast, partially purified LP was stable for 15 min at the same temperature. Martinez et al.,⁵¹ reported that approximately 75% of milk's original LP activity is present when assayed 1 h following pasteurization at 63°C for 30 min. The same investigators noted complete recovery of full enzyme activity with additional postpasteurization time beyond 1 h. In their study they further demonstrated the antimicrobial properties of the LPS reactivated by thiocyanate and hydrogen peroxide supplementation following this pasteurization protocol, 63°C/30 min. The significance of this will be geographically limited, since in many locations milk is primarily pasteurized in the continuous HTST process (72–75°C for 15 s) or sterilized in the UHT process (135–140°C for a few seconds).

The LPS has been shown to inhibit or kill specific Gram-negative and Gram-positive bacteria.⁴³ Reiter et al.⁵² demonstrated that the system was bacteriocidal for some Gram-negative pathogens, including *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. The LPS is also inhibitory toward specific psychrotrophic bacteria in milk.⁵³ This is of particular importance because the heat-stable enzymes produced by these organisms may cause highly undesirable lipolysis and proteolysis in milk and/or subsequent end products. For example, Bjorck⁵³ found the free fatty acid content in cheese produced from LPS-treated milk was five times lower than that in corresponding controls following four months of maturation. In Bjorck's study it was shown that activation of the LPS has no effect on the physicochemical properties of the milk.

Several recent studies have addressed the effectiveness of utilizing the LPS to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes*. The LPS was shown to be bacteriostatic to *Listeria monocytogenes* Scott A cultured in broth, and the net lag periods varied inversely with temperature.⁵⁴ It was then reported the LPS exhibits bacteriocidal activity against *Listeria* in raw milk at refrigeration temperatures; the activity was dependent on temperature, incubation time, and

strain of *Listeria monocytogenes*.⁵⁵ From a different perspective, Kamau et al.⁵⁶ have shown the LPS enhances the thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* suspended in milk, and they have proposed activation of the LPS, followed by heating, as a method to control milkborne pathogens.

One approach to optimize the application of the LPS is to identify/develop compatible bacteria capable of generating adequate amounts of hydrogen peroxide at target temperatures. Bacteria that would generate optimum amounts of hydrogen peroxide (extracellular concentrations of ~8 ppm) at 2–5°C would be most beneficial due to the common practice of storing milk at these temperatures. Hydrogen peroxide is generated in all known bacterial systems that utilize oxygen as an oxidant. H_2O_2 is the product of several enzymatic reactions, including those catalyzed by flavoprotein oxidases and copper-containing oxidases.⁵⁷ Examples of H_2O_2 generating reactions occurring in lactic acid bacteria are as follows (taken from Fleming et al.⁸):



Once hydrogen peroxide is produced in cells it is usually eliminated rapidly by enzyme-catalyzed reactions. The major enzyme involved in hydrogen peroxide degradation in aerobic organisms is catalase.⁵⁸ Intracellular peroxidases (hemoprotein and nonhemoprotein types) are also capable of eliminating hydrogen peroxide. Streptococci and lactobacilli organisms both contain a nonhemoprotein peroxidase which catalyzes the reduction of hydrogen peroxide to water.⁵⁹ Attempts to modify bacterial H_2O_2 production could potentially focus on the activity of either H_2O_2 -generating or H_2O_2 -degrading enzyme systems. Recent advances in genetic engineering, coupled with an increasing knowledge of hydrogen peroxide metabolism, suggests that the development of improved LPS-activating bacteria may not be unreasonable.

IV. *LACTOBACILLUS REUTERII* AND REUTERIN

An antimicrobial substance termed reuterin, produced by the obligate heterofermentative *Lactobacillus reuterii*, was discovered and characterized

through collaborative efforts of the Microbiology Departments of the Swedish University of Agricultural Sciences (Uppsala) and of North Carolina State University (Raleigh, NC). *Lactobacillus reuteri*, previously classified as a biotype of *Lactobacillus fermentum*,⁶⁰ is commonly isolated from the gastrointestinal tract of man and animals. Many strains have been characterized⁶¹ as having the ability to attach to epithelial cells, giving further credence to the belief that the preferred environment of this bacterium is the gut.

The unique antimicrobial activity associated with *L. reuteri* was first recognized by Axelsson and co-workers.⁶² Strains of *L. reuteri* isolated from pig intestine,⁶³ and the type strain ATCC 23273, were found to have a distinct inhibitory effect against *Escherichia coli*. A novel screening procedure⁶² for antimicrobial activity was developed based on measuring a decrease in B-galactosidase synthesis in *E. coli* cells induced for B-galactosidase activity, and then cocultured with potential antagonistic lactobacilli species. Using this procedure it was discovered that resting cells of certain *L. reuteri* strains could inhibit B-galactosidase activity in *E. coli*. The inhibitory effect was confirmed by testing the viability of *E. coli* cells when cocultured with *L. reuteri* and observing a decrease in viability from 10^7 cfu to 10^1 cfu after 8 h. A key observation was that the inhibitory effect was present only when either glycerol or glyceraldehyde was added as a carbon source to the coculture system. This study also described the inhibition as being active against a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The inhibitor (reuterin) was characterized^{64,65} for composition and synthesis requirements.⁶⁶ Initial investigations provided evidence that the inhibitor was not one of the common metabolic end products associated with lactic acid bacteria, such as lactic acid, acetic acid, or hydrogen peroxide. However, it was apparent that the inhibitor was a water-soluble, nonproteinaceous, neutral metabolite directly associated with glycerol metabolism. Subsequently it was determined that the inhibitor was an equilibrium mixture of monomeric, hydrated monomeric, and cyclic dimeric forms of β -hydroxypropionaldehyde (Figure 5). A pathway for reuterin synthesis was proposed as a result of experiments using uniformly labeled [^{14}C] glycerol as the substrate. The pathway is given in Figure 6.⁶⁵

A cell culture system was developed for producing sufficient quantities of reuterin for purification and chemical analysis. Pure reuterin was analyzed⁶⁵ by Fourier transform infrared spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and mass spectroscopy. Confirmation as to the composition of reuterin was provided by the chemical synthesis of β -hydroxypropionaldehyde. The synthesized compound exhibited HPLC elution patterns and antimicrobial activity essentially as those produced by reuterin isolated from *L. reuteri*. Subsequently a key enzyme in the reuterin pathway (glycerol dehydratase) was purified and characterized.⁶⁷ The mode of action of reuterin has not to date been fully elucidated. Unpublished data cited by Talarico and Dobrogosz⁶⁵ indicated that reuterin can inhibit ribonucleotide reductase activity, which may help explain its broad spectrum of activity including antibacterial, antimycotic, and antiprotozoal effects. Also cited by Talarico and Dobrogosz were experiments

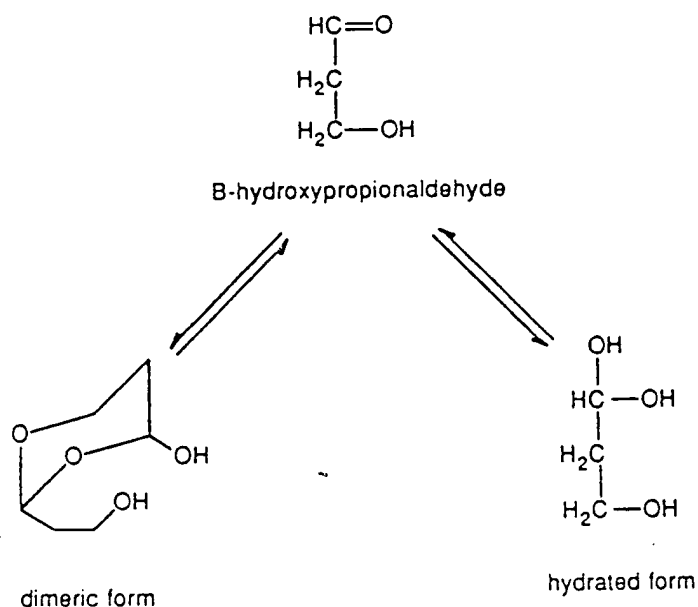


FIGURE 5. The three forms of reuterin present in aqueous solution. (From Talarico, T. and Dobrogosz, W. J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 674, 1989. With permission.)

that demonstrated that the enzyme thiodoxin was inhibited by reuterin. More definitive research needs to be conducted to determine the mode of action of reuterin.

Reuterin has a broad spectrum of activity that makes it a candidate for an assortment of antimicrobial applications. However it is not evident from the existing literature what, if any, toxicity reuterin has toward mammalian organisms. This information would almost certainly be essential for reuterin to be approved for use in clinical settings or as a direct food additive.

Several general approaches can be considered for the application of reuterin in food processing and preservation. Reuterin-producing *L. reuteri* could be added with glycerol to a food or food system to suppress or contain naturally occurring spoilage microorganisms. An example of this type of approach was demonstrated by Lindgren and Dobrogosz⁶⁸ using herring filets stored at 5°C. The filets were dipped in a solution containing 1×10^9 cfu/ml of *L. reuteri* and 250 mM glycerol. Controls consisted of untreated herring and a non-reuterin producing strain of *L. reuteri* with glycerol. It was observed that initial levels of Gram-negative bacteria ($\sim 1 \times 10^5$ cfu/g) rose to approximately 1×10^8 cfu/g in 6 d with untreated fish, whereas with *L. reuteri*-treated fish, the numbers of Gram-negative bacteria rose only about 1 log within the same time period (Figure 7). The above-described experiment illustrates the potential of *L. reuteri* to extend the economic shelf life of perishable raw products such as refrigerated herring. What effects, if any, the addition of *L. reuteri* would have on sensory characteristics was not addressed.

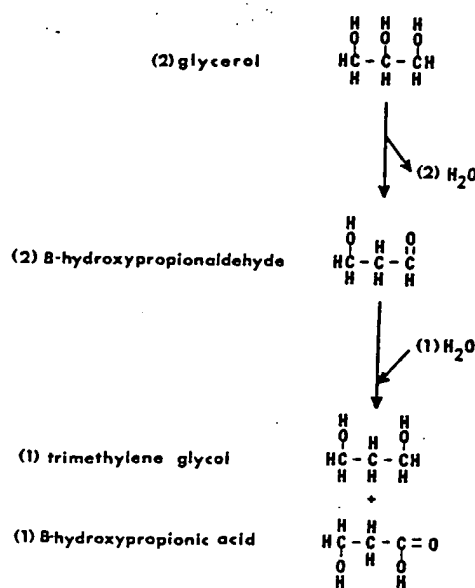


FIGURE 6. Proposed pathway of glycerol fermentation in *L. reuteri*. Glycerol is converted to β -hydroxypropionaldehyde by a dehydrase. Two molecules of the aldehyde then undergo an aldehyde dismutation to form equimolar quantities of TMG and β -HPA. (From Talarico, T., Ca, I. A., Chung, T. C., and Dobrogosz, W. J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 18754, 1988. With permission.)

A symbiotic relationship between *L. reuteri* and its host (animal digestive tract) was postulated and discussed by Chung et al.⁶⁶ It was proposed that *L. reuteri* may exist as an enteric symbiont and benefit the host by regulating the intestinal microflora and by preventing invasive pathogenic microorganisms from becoming established. A mechanism for this system was suggested to be the induction of reuterin synthesis, and excretion by physical contact by heterologous microbial cells. The process termed "heterologous induction" may have application in the promotion of animal health in commercial food species. Significant weight gains (20–30%) in commercially raised poultry have been observed (W.J., Dobrogosz, private communication) in birds that had reuterin-producing *L. reuteri* introduced into their digestive systems. The weight was believed to be the result of reuterins antagonizing or inhibiting intestinal microflora that can compromise avian health.

Lastly, another application approach, in systems where the intentional addition of microorganisms would not be desirable, would entail the direct addition of purified reuterin or reuterin-containing supernatants. An effective food preservative should be stable under conditions in which it is expected to be used. Studies on the stability of reuterin⁶⁴ indicated a half life of 14 d at 37°C and pH 6.5. Reuterin was also shown to be more stable under acidic conditions

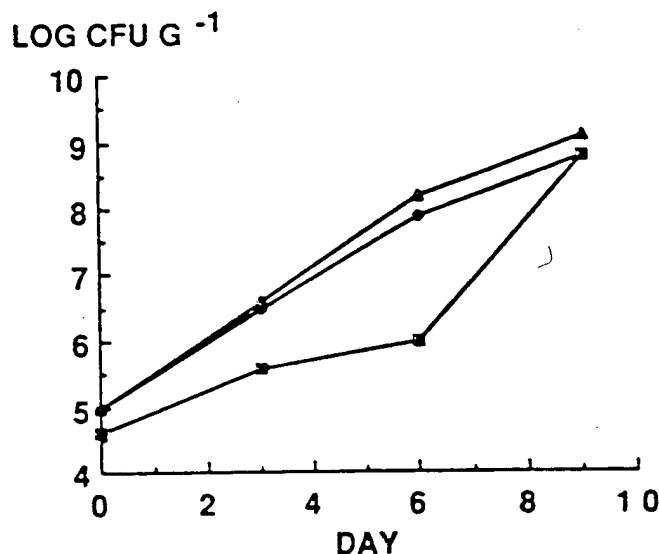


FIGURE 7. Levels of Gram-negative bacteria in herring filets stored in 100% N₂ at 5°C: Δ, nontreated control; ○, treatment with *L. reuterii* 1068 (nonreuterin producer) and glycerol; ■, treatment with *L. reuterii* 1063 (reuterin producer) and glycerol (5 replicates). (From Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J., *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 149, 1990. With permission.)

and irreversibly inactivated under alkaline conditions. However it was observed to be very stable (no decrease in activity within 6 months) when held at 5°C. Thus, the potential of reuterin as a food preservative would likely be with foods or beverages held under refrigeration temperatures. An example of such an application was reviewed by Daeschel,⁶⁹ in which reuterin was added to ground beef held at 4°C. Decreases in coliform populations were observed when 50 to 100 units of reuterin were added to the meat while control samples (no reuterin added) had 4 log increases in coliform populations (Figure 8).

V. CONCLUDING REMARKS

Studies addressing antagonistic activities in the lactic acid bacteria have clearly shown that antagonism can stem from a variety of secondary and primary metabolites. Low-molecular weight metabolites such as hydrogen peroxide and reuterin, in contrast to bacteriocins, are inhibitory to a broad spectrum of microorganisms, a desirable characteristic for food preservatives. However, compounds like hydrogen peroxide are highly reactive and interact with food components, hence limiting their usefulness. In situ generation of hydrogen peroxide by lactic acid bacteria in foods is an appealing preservation strategy, however the amounts generated by most lactic acid bacteria, with the

EFFECT OF REUTERIN ON COLIFORMS IN GROUND BEEF

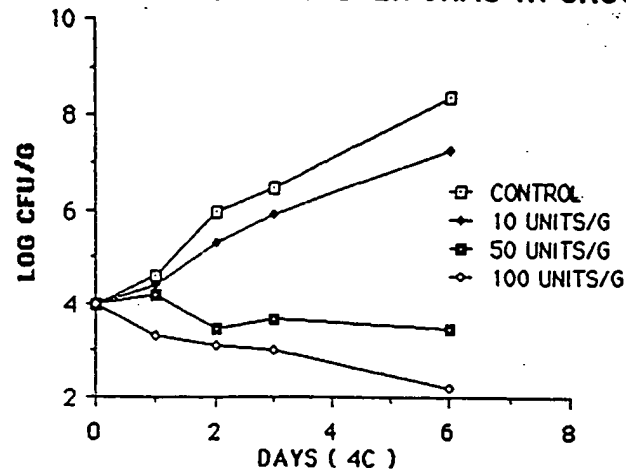


FIGURE 8. Effect of reuterin on coliforms in ground beef. (From Daeschel, M. A., *Food Technol.*, 43, 164, 1989. With permission.)

notable exception of some lactobacilli, are of insufficient quantity to produce significant preservation effects. Perhaps this limitation could be surmounted by genetic manipulation of the cellular regulatory systems governing hydrogen peroxide production and degradation, i.e., hyper hydrogen peroxide-producing starter cultures that are insensitive to amounts produced. An intriguing observation recently reported²³ was the production and accumulation of very large amounts of hydrogen peroxide by *Lactobacillus leichmanii* when it was cultured with saturated fatty acids. Additional research is warranted to further the understanding of how to manipulate hydrogen peroxide production. Furthermore, increased knowledge of starter culture hydrogen peroxide production would allow lactoperoxidase systems to function more efficiently by having optimum substrate amounts of hydrogen peroxide available. Also, in regard to the LPS, a better understanding of how the toxic primary products (hypothiocyanite and thiocyanogen) kill microorganisms would allow the development of more efficacious preservation approaches. New and continuing investigations are to be encouraged to understand the unique metabolite reuterin and how best to utilize its preservation properties. The study of microbial metabolites is an exciting endeavor with new and applicable information being published regularly. It is hoped the research momentum continues, and that highly efficacious, economic, and safe preservation strategies using microbial metabolites become viable alternatives or supplements to existing food preservatives.

REFERENCES

1. Lewis, R. J., *Food Additives Handbook*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1989, 252.
2. von Bockelmann, B., Aseptic packaging, in *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 4th ed., Block, S. S., Ed., Lea & Feabiger, Philadelphia, 1991, 839.
3. Anon., Substances generally recognized as safe, *Code of Federal Regulations*, Title 21, Part 182, Food and Drug Administration, Washington, D.C., 1981, 1366.
4. Block, S. S., Peroxygen compounds, in *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, Block, S. S., Ed., 4th ed., Lea & Feabiger, Philadelphia, 1991, 169.
5. Davidson, P. M., Post, L. S., Branen, A. L., and McCurdy, A. R., Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials, in *Antimicrobials in Foods*, Marcel Dekker, New York, 1983, 385.
6. Khan, T., Tahis, M.A., and Elahi, M., Decomposition with various food additives of residual hydrogen peroxide used for preservation of raw milk, *Aust. J. Dairy Technol.*, 30, 364, 1975.
7. Foegeding, P. M., and Busta, F. F., Chemical food preservatives, in *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 4th ed., Block, S. S., Ed., Lea & Feabiger, Philadelphia, 1991, 820.
8. Fleming, H. P., McFeeters, R. F., and Daeschel, M. A., The lactobacilli, pediococci, and leuconostocs: vegetable products in *Bacterial Starter Cultures for Foods*, Gilliland, S. E., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 97, 1985, p. 97.
9. Mattick, A. T. R. and Hirsch, A., A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci, *Nature (London)*, 154, 551, 1944.
10. Oxford, A. E., Diplococcin, an antibacterial protein elaborated by certain milk streptococci, *Biochem. J.*, 38, 178, 1944.
11. Wheeler, D. M., Hirsch, A., and Mattick, A. T. R., Latcobaillin, an antibiotic from lactobacilli, *Nature (London)*, 168, 659, 1951.
12. Wheeler, D. M., Hirsch, A., and Mattick, A. T. R., Possible identity of "lactobacillin" with hydrogen peroxide produced by lactobacilli, *Nature (London)*, 170, 623, 1952.
13. Dahiya, R. S. and Speck, M. L., Hydrogen peroxide by lactobacilli, and its effects on *Staphylococcus aureus*, *J. Dairy Sci.*, 51, 1568, 1968.
14. Price, R. J. and Lee, J. S., Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli, *J. Milk Food Technol.*, 33, 13, 1970.
15. Collins, E. B. and Aramaki, K., Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*, *J. Dairy Sci.*, 63, 353, 1980.
16. Gilliland, S. E. and Speck, M. L., Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures, *J. Food Prot.*, 40, 820, 1977.
17. Hamdan, I. Y. and Mikolajick, E. M., Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*, *J. Antibiot.*, 27, 631, 1974.
18. Vakil, J. R. and Shahani, K. M., Partial purification of antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteriol. Proc.*, 9, 1965.
19. Vincent, C. G., Veonett, R. C., and Riley, R. G., Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*, *J. Bacteriol.*, 78, 477, 1959.
20. Anders, R. F., Hogg, D. M., and Jago, G. R., Formation of hydrogen peroxide by group N streptococci and its effect on their growth and metabolism, *Appl. Microbiol.*, 19, 608, 1970.
21. Whittenbury, J. R., Hydrogen peroxide formation and catalase production in lactic acid bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, 35, 13, 1964.
22. Sharpe, E. L., Lactic acid bacteria in the dairy industry, *J. Soc. Dairy Technol.*, 32, 9, 1979.

23. Nunez de Kairuz, M. S., Olazabal, M. E., Oliver, G., Pesce de Ruiz Holgado, A. A., Massa, E., and Farias, R. N., Fatty acid dependent hydrogen peroxide production in *Lactobacillus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 152, 113, 1988.
24. Ross, G. D., The inhibition of growth of spoilage microorganisms in milk by *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* and *L. dextranicum*, *Aust. J. Dairy Technol.*, 36, 147, 1981.
25. Raccach, M. and Baker, R. C., Formation of hydrogen peroxide by meat starter cultures, *J. Food Prot.*, 41, 798, 1978.
26. Babel, F. J., Antibiosis by lactic culture bacteria, *J. Dairy Sci.*, 60, 815, 1977.
27. Gilliland, S. E., Role of starter culture bacteria in food preservation, in *Bacterial Starter Cultures for Foods*, Gilliland, S. E., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, 177.
28. Juffs, H. S. and Babel, F. J., Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature, *J. Dairy Sci.*, 58, 1612, 1975.
29. Gilliland, S. E. and Speck, M. L., Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in nonfermented refrigerated foods, *J. Food Sci.*, 40, 903, 1975.
30. Martin, D. R. and Gilliland, S. E., Inhibition of psychrotrophic bacteria in refrigerated milk by lactobacilli isolated from yogurt, *J. Food Prot.*, 43, 675, 1980.
31. Agner, K., Verdoperoxidase, *Acta Physiol. Scand.*, 2, 1, 1941.
32. Wright, R. C. and Tramer, J., Factors influencing the activity of cheese starters, the role of milk peroxidase, *J. Dairy Res.*, 25, 104, 1958.
33. Theorell, H. and Åkesson, A., Purified milk peroxidase, *Arkiv. Kemi. Miner. Geol.*, 17B, 7, 1943.
34. Morrison, M., Allen, P. Z., Bright, J., and Jayasinghe, W., Lactoperoxidase V. Identification and isolation of lactoperoxidase from salivary gland, *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 126, 1965.
35. Tenovuo, J. O. and Pruitt, K. M., Eds., The peroxidase system in human secretions in the lactoperoxidase system, in *The Lactoperoxidase System*, Marcel Dekker, New York, 1985, 101.
36. Reiter, B., Review of the progress of dairy science: antimicrobial systems in milk, *J. Dairy Res.*, 45, 131, 1978.
37. Paul, K. and Ohlsson, P., The chemical structure of lactoperoxidase, in *The Lactoperoxidase System*, Pruitt, K. M. and Tenovuo, J. O., Eds., Marcel Dekker, New York, 1985, 15.
38. Walsh, C., *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Bartlett, A. C. and McCombs, L. W., Eds., W. H. Freeman, San Francisco, 1979, 488.
39. Thomas, E. L., Products of lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate and halides, in *The Lactoperoxidase System*, Pruitt, K. M. and Tenovuo, J. O., Eds., Marcel Dekker, New York, 1985, 31.
40. Aune, T. M. and Thomas, E. L., Accumulation of hypothiocyanite ion during peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion, *Eur. J. Biochem.*, 80, 209, 1977.
41. Pruitt, K. M., Tenovuo, J., Andrews, R. W., and McKane, T., Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: polarographic study of the oxidation products, *Biochemistry*, 21, 3, 562, 1982.
42. Thomas, E. L., Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: equilibria between oxidized forms of thiocyanate, *Biochemistry*, 20, 3273, 1981.
43. Pruitt, K. M. and Reiter, B., Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects, in *The Lactoperoxidase System*, Pruitt, K. M. and Tenovuo, J. O., Eds., Marcel Dekker, New York, 1985, 143.
44. Aune, T. M. and Thomas, E. L., Oxidation of protein sulfhydryls by products of peroxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate ion, *Biochemistry*, 17, 1005, 1978.
45. Tenovuo, J., Mansson-Rahemtulla, B., Pruitt, K. M., and Arnold, R., Inhibition of dental plaque acid production by the salivary lactoperoxidase antimicrobial system, *Infect. Immun.*, 34, 1, 208, 1981.
46. Aune, T. M. and Thomas, E. L., Lactoperoxidase-catalyzed incorporation of thiocyanate ion into a protein substrate, *Biochemistry*, 16, 4611, 1977.

47. Bjoerck, L. and Claesson, O., Correlation between concentration of hypothiocyanate and antibacterial effect of the lactoperoxidase system against *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.*, 63, 919, 1980.
48. Reiter, B., The lactoperoxidase system of bovine milk, in *The Lactoperoxidase System*, Pruitt, K. M. and Tenovuo, J. O., Eds., Marcel Dekker, New York, 1985, 123.
49. Reiter, B. and Harnulv, G., Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical application, *J. Food Prot.*, 47, 724, 1984.
50. Reiter, B. and Harnulv, G., The preservation of refrigerated and uncooled milk by its natural lactoperoxidase system, *Dairy Ind. Int.*, 47, 13, 1982.
51. Martinez, C. E., Mendoza, P. G., Alacron, F. J., and Garcia, H. S., Reactivation of the lactoperoxidase system during raw milk storage and its effect on the characteristics of pasteurized milk, *J. Food Prot.*, 51, 558, 1988.
52. Reiter, B., Marshall, V. M. E., Bjoerck, L., and Rosen, C., Nonspecific bactericidal activity of the lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system of milk against *Escherichia coli* and some Gram-negative pathogens, *Infect. Immun.*, 13, 800, 1976.
53. Bjoerck, L., Antibacterial effect of lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk, *J. Dairy Res.*, 45, 109, 1978.
54. Siragusa, G. R. and Johnson, M. G., Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H₂O₂ antimicrobial system, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2802, 1989.
55. Gaya, P., Medina, M. and Nuñez, M., Effect of lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* — behavior in raw milk at refrigeration temperatures, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3355, 1991.
56. Kamau, D. N., Doores, S., and Pruitt, K. M., Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2711, 1990.
57. Thomas, E. L., Bacterial hydrogen peroxide production, in *The Lactoperoxidase System*, Pruitt, K. M. and Tenovuo, J. O., Eds., Marcel Dekker, New York 1985b, 179.
58. Schonbaum, G. R. and Chance, B., Catalase, in *The Enzymes*, Boyer, P., Ed., Academic Press, New York, 1976.
59. Walker, G. A. and Kilgour, G. L., Pyridine nucleotide oxidizing enzymes of *Lactobacillus casei*: oxidase and peroxidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 534, 1965.
60. Lerch, M. and Reuter, G., Das Vorkommen aerob weachsender Gram-positiver Stabchen des genus *Lactobacillus* Beijerinck im Darminhalt Erwachsener Menschen, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* 1 (Abt. Orig.), 185, 446, 1962.
61. Sherman, L. A. and Savage, D. C., Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse epithelium, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 302, 1986.
62. Axelsson, L., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., and Lindgren, S., Production of a broad spectrum antimicrobial substance from *Lactobacillus reuteri*, *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2, 131, 1989.
63. Axelsson, L. and Lindgren, S., Characterization and DNA homology of *Lactobacillus* strains isolated from pig intestine, *J. Appl. Bacteriol.*, 62, 433, 1987.
64. Talarico, T., Casas, I. A., Chung, T. C., and Dobrogosz, W. J., Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, 1854, 1988.
65. Talarico, T. and Dobrogosz, W. J., Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33, 674, 1989.
66. Chung, T. C., Axelsson, L., Lindgren, S. E., and Dobrogosz, W. J., In vitro studies on reuterin synthesis *Lactobacillus reuteri*, *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2, 137, 1989.
67. Talarico, T. and Dobrogosz, W. J., Purification and characterization of glycerol dehydratase from *Lactobacillus reuteri*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1195, 1990.
68. Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J., Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 149, 1990.
69. Daeschel, M. A., Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives, *Food Technol.*, 43, 164, 1989.